

厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業
食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
(H27-食品-一般-008)

平成 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡邊 治雄

平成 29 年（2017 年） 3 月

厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業
平成 28 年度 総括・研究分担報告書

目次

I. 平成 28 年度総括研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究

研究代表者 渡邊 治雄 国立感染症研究所 1

II. 平成 28 年度分担研究報告書

1. 家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARM と JANIS の連携について

研究分担者 川西 路子 農林水産省動物医薬品検査所 7

2. 家畜に由来する薬剤耐性菌が食品へ伝播する経路に関する研究

研究分担者 浅井 鉄夫 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 22

3. 全国地方衛生研究所において分離される薬剤耐性菌の情報収集体制の構築

研究分担者 四宮 博人 愛媛県立衛生環境研究所 27

4. ヒトおよび食品由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究

研究分担者 小西 典子 東京都健康安全研究センター 40

5. ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学

研究分担者 倉園 貴至 埼玉県衛生研究所 48

6. 国内の市販鶏肉における ESBL 酸性大腸菌およびバンコマイシン耐性腸球菌 VRE の分布状況とその諸性状に関する研究

研究分担者 五十君 静信 東京農業大学 生物応用化学科 58

7. JANIS 事業と JVARM の連携;食品

研究分担者 柴山 恵吾 国立感染症研究所 63

8. 非チフスサルモネラ症の起因菌の薬剤耐性に関する研究

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 68

9. 食品由来の多剤耐性菌（ESBL/AmpC 産生菌、VRE など）の疫学調査 研究分担者 富田 治芳 群馬大学大学院医学系研究科	73
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	85

平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金食品安全確保推進研究事業
総括研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究

代表研究者 渡邊治雄 国立感染症研究所客員研究員

1) 研究要旨：

- a) WHOが実施するサーベイランスGLASSが求める血液由来大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Salmonella*属菌、尿由来の大腸菌、*K. pneumoniae*、便由来のサルモネラ属菌、赤痢菌について、年齢、性別、外来入院別で各種薬剤の耐性の割合をJANIS上で集計し、WHO-GLASSが求める形式に変換できるプログラムの開発ができつつある。
- b) サルモネラについては JANIS のデータは数が少ないので、地方衛生研究所におけるデータを利用する方向での検討を行った。H28 年度に 17 か所の研究協力地研を選定し、各地研で分離された患者及び食品由来サルモネラ属菌について 18 種類の抗菌剤に対する薬剤感受性試験を実施した。感受性検査のプロトコルを標準化し、用いる試薬・器具類も同一のものを使用し、共通の感受性-耐性判定基準を用いて判定した結果が出そろい、WHO への報告に利用できる方向である。
- c) JANIS と JVARМ との連携；相互比較：JANIS 集計用プログラムを一部改変し移植した JVARМ データサーバーに、JVARМ の農場由来（平成 26 年～27 年）及びと畜場由来（平成 24～26 年度）大腸菌について、データの入力作業を実施し、アンチバイオグラムを作成した。JANIS で測定されるヒト用の薬剤と JVARМ で測定される動物用の薬剤の相関を確認するため、JANIS の調査薬剤（LVFX、CTX、MINO、PIPC、AMK）の微量液体希釈法による MIC と、それぞれと同系統の JVARМ の調査薬剤（ERFX、CTF、OTC、ABPC、KM）の寒天平板希釈法による MIC を相関係数等によって比較した結果、ERFX、OTC、ABPC については、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、それぞれの薬剤での耐性を比較できることが確認された。しかし、AMK と KM については相関係数が低く、今後検討が必要である。さらにコリスチンについて、測定法間での相関が低い傾向があったが、同一の測定法を用いる限り比較可能であることが確認された。
- d) 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出：大腸菌（鶏肉由来 159 株、豚肉由来 55 株、牛肉由来 46 株）を対象にコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* 保有状況を調べた。市販食肉中の *mcr-1* 保有大腸菌の検出率は鶏肉で 12.7%、豚肉で 2.0%であった。*mcr-1* 保有大腸菌が検出された鶏肉は、国産が 6 検体、ブラジルが 1 検体、豚肉はスペイン産であった。牛及び鶏糞便由来株からも分離され、若干増加傾向がみられ、2014 年でも 10 株程度が検出された。

分担研究者：

四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所
五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所
大西 真	国立感染症研究所
川西路子	農水省動物医薬品検査所
浅井鉄夫	岐阜大学大学院連合獣医学研究科
小西典子	東京都健康安全研究センター
倉園貴至	埼玉県衛生研究所
柴山恵吾	国立感染症研究所
富田治芳	群馬大学大学院

A. 研究目的：

耐性菌の問題は健康危機管理としても重要な国際的課題である。WHO は、世界における耐性菌の実態を明らかにするため Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) を設立し、食中毒菌などの薬剤耐性の国際的なサーベイランス体制の確立や検査法の統一を図ってきている。また、WHO は耐性菌の世界的コントロールをめざし、2015 年の WHO

総会において global action plan を示し、各国に今後 5 年間の耐性菌対策の行動計画 (National action plan) を作成することを求めた。この action plan においては“ One Health ”の立場からの integrated surveillance の構築を求めている。研究代表者は今までに国内においては厚労省、農林省に働きかけ、各省で行っている耐性菌サーベイランスの統合を行ってきた。農林省で動物を対象に行われている耐性菌モニタリングシステム JVARМ と厚労省で行われているヒトにおける院内感染症耐性サーベイランス JANIS のデータを総合的に解析できるようにすることを目指してきた。今回の研究班では、JVARМ-JANIS の相互変換の構築とその効果の評価を行うこと、及び食品由来細菌の耐性状況のデータを組織的に収集し、動物-ヒトのデータに繋ぐ体制の構築を行うことを目的とする。JVARМ-JANIS においては、食品由来細菌やヒトからの食中毒関連細菌の薬剤耐性のデータが収集できていないので、その分野の検査を行っている地方衛生研究所の集まりである全国地方衛

生研究所協議会を班員に加え、協力体制を組むことにした。国内で分離された臨床、食品および家畜由来耐性菌の比較解析を行い、その関連性を解明することにより、耐性菌のグローバルな循環を明らかにし、リスク評価および行政対策に供することができる。これらのデータの作成とその維持管理を行える体制を構築することにより、WHOが求める”One Health”における integrated surveillance が構築でき国際的なネットワークへの対応が可能となる。

B. 研究方法：

- (1) 食品、家畜および医療分野の検査手法（薬剤の種類、遺伝子検査法など）を相互比較可能にして、第3世代セファロスポリン耐性大腸菌、サルモネラ等の腸内細菌における耐性遺伝子の同定及び各種セフェム系薬剤に対する感受性試験を実施する。WHOのAMRやUSAのAMR会議に参加（渡邊）し、その情報を還元するとともに、サーベイランスの統合の調整を行う。サルモネラ、大腸菌、カンピロバクターについて、動物由来株（担当：川西、浅井）、食品由来株（四宮、小西、倉園、五十君、富田）、人由来株（四宮、小西、倉園、大西、柴山）の菌株の収集、耐性表現型、耐性遺伝子の解析を行う。食品由来VREの解析を行う（富田）。JANIS院内感染由来の菌の収集、解析を行う（柴山）。
- (2) JVARMの大腸菌のアンチバイオグラムを作成するために活用したJANIS集計用プログラムを一部改変し移植したJVARMデータサーバーに、JVARMの大腸菌のデータを加工・入力し、アンチバイオグラムを作成した。それによりお互いのデータの相互変換および比較ができるようにする。JANISの調査薬剤（LVFX、CTX、MINO、PIPC、AMK、コリスチン）の微量液体希釈法によるMICと、それぞれと同系統のJVARMの調査薬剤（ERFX、CTF、OTC、ABPC、KM、コリスチン）の寒天平板希釈法によるMICを相関係数等によって比較した。JVARMで2009年に収集した113株のレボフロキサシン（LVFX）に対するMIC値を微量液体希釈により測定した。既にJVARMで測定した寒天平板希釈法によるエンロフロキサシン（ERFX）及び微量液体希釈法によるシプロフロキサシン（CPFX）のMICと今回測定した。LVFXのMICについて、相関係数（スピアマン）、感度及び特異度を計算し、相関性について検討した。
- (3) 家畜由来の薬剤耐性及び耐性遺伝子が、食品を介してヒトの健康へ悪影響を与える可能性とその程度を科学的に評価するため、フードチェーンにおける情報の収集が重要な課題である。このため、肉養鶏から鶏肉処理過程での薬剤耐性菌の伝播状況を明らかにする必要がある。①肉養鶏生産農場におけるセファロスポリン耐

性菌の浸潤状況を定量的に調査し、②食肉処理過程での耐性菌の伝播の程度を調査する。ヒト、食品、家畜から分離される腸内細菌（大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター、VREなど）に関して薬剤耐性状況を調査するとともに、分離菌について分子生物学的手法等（薬剤感受性試験、耐性遺伝子型別及びPFGE法による遺伝子型別）を用いて比較解析し、耐性菌あるいは耐性遺伝子の伝播経路を解明する。

- (4) 国内で市販される国産鶏肉及び輸入鶏肉を供試検体とし、ESBL産生大腸菌、VREを分離する。なお、供試検体は、地域的なバイアスがかからないように配慮し、多系列の複数店舗から購入し、産地（都道府県）が特定されている若鶏、もも肉に限定した。ESBL産生確認のためにCTX、CAV、CAZディスク、AmpC産生確認のためにCTX、ボロン酸、CAZディスクをそれぞれ用いたディスク拡散法（DDST）を行った。CTXに対してR（耐性）またはI（中間）であった株についてAmpC/ESBL鑑別ディスク（関東化学）を用いてESBL産生菌およびAmpC産生菌のスクリーニング試験を行った。各々の耐性遺伝子型（ESBL；TEM, SHV, CTX-M, およびAmpC；MOX, CIT, DHA, ACC, EBM, FOX）の確認には各種特異的プライマーを用いたPCR法を用いた。
- (5) VREの検出：培地；腸球菌分離にはEnterococcusel Broth（BBL）、Bile Esculin Azide agar（Difco）およびBrain Heart Infusion agar（Difco）を使用。用いた薬剤；バンコマイシン（VCM）、テイコプラニン（TEIC）腸球菌の分離；VRE検出のための選択的方法を用いた。VREの検出にはvanA, vanB, vanC1, vanC2/3, vanN, 各種ddlの特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCR法を用いた。必要に応じてDNAシーケンス解析（Big Dye primer法）、PFGE解析、MLST解析を行った。
- (6) 薬剤の最少発育阻止濃度（以下MIC）は、Clinical Laboratory Standards Institute（CLSI）法に準拠したドライプレート‘栄研’（栄研化学、栃木）を用いた微量液体希釈法、あるいはCLSIの方法に従い、センシディスク（BD）を用いたKB法で薬剤感受性を調べた。により決定した。供試薬剤は、アンピシリン（ABPC）、CEZ、セフトキシム（CTX）、メロペネム（MEPM）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、ナリジクス酸（NA）、シプロフロキサシン（CPFX）、コリスチン（CL）、クロラムフェニコール（CP）、トリメトプリム・スルファメトキサゾール（ST）の12剤を用いた。必要に応じ、ストレプトマイシン（SM）、ノルフロキサシン（NFLX）、オフロキサシン（OFLX）、スルフィソキサゾール（Su）、ホスホマイシン（FOM）、アミカシン（AMK）、イムペネム（IPM）を加えた。

C. 研究結果:

- 1) 2016 年 4 月 25 日開催された UK Wellcome Trust 主催の「薬剤耐性菌会議」に渡邊が出席した。WHO の global action plan への対応として UN (国連) への提案事項に関して話し合われた。WHO の進める GAP への国連としてのエンドースが必要なことが合意された。
- 2) WHO への耐性菌報告に向けて:
 - a) WHO が実施するサーベイランス GLASS が求める血液由来大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* Salmone *I*la 属菌、尿由来の大腸菌、*K. pneumoniae*、便由来のサルモネラ属菌、赤痢菌について、年齢、性別、外来入院別で各種薬剤の耐性の割合を JANIS 上で集計し、GLASS が求める形式に変換できるプログラムを開発している。GLASS は薬剤耐性に関して性別、年齢別に層別化したデータを求めており、そのデータを GLASS が指定する様式で提出する必要があるため、GLASS 提出ファイル作成のツールを作成した。現在、このツールで層別化した集計を行っている。なお、GLASS はサルモネラ属菌については血液由来のデータも求めているため、JANIS のデータベースから必要なデータを抽出するとともにこれについても別途解析プログラムを作成した。2015 年に JANIS 参加医療機関から提出されたデータでは、男性、女性全ての年齢層で血液から分離されたサルモネラの薬剤耐性の割合は、IPM は 0% (0/504)、MEPM は 0% (0/513)、CTX は 0% (0/405)、CTX は 0.3% (1/363)、CAZ は 0% (0/529)、LVFX は 0.3% (2/572)、CPFX は 0% (0/224) だった。地方衛生研究所が収集、解析している人便由来株のデータとほぼ同様の結果と考えられる。血液由来サルモネラについても、現在 GLASS に提出のため層別化した集計を進めている。
 - b) 全国の地方衛生研究所 (以下、地研) の協力を得て (地域性等を考慮した 18 地研)、ヒト (有症者、大部分は便検体) 及び食品 (大部分は国産鶏肉) から、2015 年～2016 年に分離されたサルモネラ株 917 株の薬剤耐性状況を調査した。ヒト由来株 (651 株) の 42.4%、食品由来株 (266 株) の 89.8% が、1 剤以上の抗菌剤に耐性を示した。それぞれにおいて、2015 年分離株と 2016 年分離株はほぼ同じ耐性率を示し、現在の日本における状況を反映していると考えられる。多剤耐性状況については、ヒト由来株、食品由来株ともに 3 剤耐性が多かった。6 剤～10 剤に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 6 株、食品由来株中に 22 株認められた。また、それぞれ独立に採取したヒト由来株と食品由来株の間で、各

種抗菌剤に対する耐性率に明瞭な類似性が認められたことから、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が示唆された。さらに、食品から分離された血清型と分離されなかった血清型別にヒト由来株の耐性率を比較すると、前者では 56.8%、後者では 19.1% と顕著な差違が認められ、この点でも食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。

- 3) JANIS と JVARM との連携; 相互比較
薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランの戦略 2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」が項目として記載されている。本研究では当該データの連携を実施するため、①厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) 集計用プログラムを一部改変し移植した動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) データサーバーに、JVARM の農場由来 (平成 26 年～27 年) 及びと畜場由来 (平成 24～26 年度) 大腸菌について、データの入力作業を実施し、アンチバイオグラムを作成した。また、② JANIS で測定されるヒト用の薬剤と JVARM で測定される動物用の薬剤の薬剤耐性の相関を確認するため、JANIS の調査薬剤 (ミノサイクリン; MINO、ピペラシリン; PIPC、アミカシン; AMK) の微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) と、それぞれと同系統の JVARM の調査薬剤 (オキシテトラサイクリン; OTC、アンピシリン; ABPC、カナマイシン; KM) の寒天平板希釈法による MIC を相関係数等によって比較し、関係について検討した。ABPC については、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、PIPC との MIC の比較に用いられると考えられた。OTC については特異度が低く、MINO 耐性の検出には有効であるが、比較の際は注意が必要と考えられた。KM については相関係数が低く、AMK との比較に用いるには検討が必要であることが確認された。さらにヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチンについて、薬剤感受性試験法である E-test、微量液体希釈法、寒天平板希釈法の 3 法による MIC の相関を検討した。E-test における MIC は寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し、低い傾向が認められた。寒天平板希釈法は微量液体希釈法と比較し、MIC がやや高い株が認められたものの、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、共にモニタリングに有用であることが確認された。
- 4) 食品中の耐性菌の状況
 - a) 150 検体 (国内産鶏肉を 90 検体、輸入鶏肉

を60検体)のESBL産生菌の陽性率は52.9%、AmpC産生菌の陽性率は59.5%であった。ESBL産生菌は国内産鶏肉から高頻度で検出され(国内産78.3%、輸入27.9%)、AmpC産生菌の検出率も国内産が83.3%、輸入食肉が36.1%であり国内産の方が高かった。JVARMで調べられたブロイラー糞便中のセファロスポリン耐性率は下がっている(2~3%になってきている)のに、国内産の鶏肉の耐性率が高い理由として、食鳥処理場における交差汚染が考えられる(人から分離されるESBL率が高いのも食品の汚染率が高いことと相関がある)。そこで、食鳥処理の各工程で使用された汚水の細菌検査を実施した。内臓処理工程の汚水から、ESBL、CMY-2耐性大腸菌が分離された。

b) 国内の市販鶏肉におけるESBL産生大腸菌の汚染実態ならびに分離株の遺伝特性に関する調査・検討を行った。ESBL産生大腸菌は国内の市販鶏肉を高率で汚染している実態が明らかとなった。ESBL産生大腸菌分離株では、ヒト臨床分離株と重複する遺伝性状及び伝達性を有するプラスミドレプリコン型が認められ、鶏肉を介した当該菌伝播がヒト健康危害に関与する可能性が想定された。

5) 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出:

2015年に都内で流通した鶏肉55検体、豚肉49検体、牛肉47検体を供試した。これら検体から分離された大腸菌(鶏肉由来159株、豚肉由来55株、牛肉由来46株)を対象にコリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* 保有状況を調べた。その結果、鶏肉7検体由来8株および豚肉1検体由来1株が陽性となり、市販食肉中の *mcr-1* 保有大腸菌の検出率は鶏肉で12.7%、豚肉で2.0%であった。*mcr-1* 保有大腸菌が検出された鶏肉は、国産が6検体、ブラジルが1検体、豚肉はスペイン産であった。国内家畜糞便由来 *mcr-1* 大腸菌は、2008年に豚由来株で初めて確認された。その後、牛及び鶏由来株からも分離され、若干増加傾向がみられ、2014年でも10株程度が検出された(JVRAM)。

6) 肉養鶏農場における薬剤耐性菌の抗菌薬投与後の変動と出現要因:

最初に、初生ヒナ導入5~7日にアモキシシリンと25~27日目にST合剤を投与する肉用鶏生産農場で、アンピシリン耐性とセファロスポリン耐性菌の動向について2鶏群を対象に調べた。糞便中の大腸菌に対するアンピシリン耐性大腸菌の割合は、アモキシシリン投薬後とST合剤投薬後に増加し、交差耐性と共耐性の影響で耐性菌が選択されていると考えられた。一方、セファロスポリン耐性菌は1鶏群のみで認められ、大腸菌(CMY-2とCTX-M-3)の他、CTX-M-3型ESBL産生 *Klebsiella*

pneumoniae と *Enterobacter cloacae* であった。次に、肉用鶏農場でのセファロスポリン耐性菌の分布要因を検討するため、3孵化場から導入したヒナの盲腸便におけるセファロスポリン耐性菌の汚染実態について敷紙を用いて調査した。敷紙66検体中、CTX-M-25産生 *E. cloacae* が4検体及びCTX-M-25産生 *K. pneumoniae* が1検体から分離され、導入雛が農場での耐性菌分布に関与することが示唆された。最後に、鶏肉等で交差汚染が認められた食鳥処理場で、食鳥処理の各工程で使用された汚水の細菌検査を実施した。大腸菌は、内臓処理工程の汚水2検体のみで検出され、1検体でセファロスポリン耐性大腸菌(CMY-2)が分離された。汚水中の大腸菌に対する割合は、約100分の1であった。同日に処理された2個体の糞便からは、CMY-2及びCTX-M-2G産生大腸菌が分離された。

7) ヒトや食品等の環境から分離される食中毒菌の血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析:

a) 埼玉県内で2016年に分離され、供試したヒト(散発下痢症例及び健康保菌者)由来サルモネラは187株で44血清型に型別された。薬剤耐性では73株(39.0%)が供試した16薬剤のいずれかに対して耐性を示した。CTX耐性は5株、フルオロキノロン耐性は1株分離された。動物由来株は、イヌ96頭、ネコ55頭および野生アライグマ181頭の検査を行い、アライグマ2頭からサルモネラが分離されたが、感受性株であった。

b) 環境(家畜、食肉)からヒトへの伝播・拡散が危惧される多剤耐性腸内細菌科菌(ESBL産生菌、AmpC産生菌)およびバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)について国内で流通する食肉検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。2015年度(2016年2~3月)に収集した国内産食肉(鶏肉)150検体、輸入食肉(鶏肉)76検体の合計226検体を調査した。ESBL産生菌は37検体陽性(16.4%)、AmpC産生菌は39検体陽性(17.3%)であり、それらの分離頻度は昨年度までと比較し、いずれも低いものであった(昨年度はESBL産生菌52.9%、AmpC産生菌59.5%の検出率)。ESBL産生菌は輸入鶏肉から高頻度で検出され(国内産8.7%、輸入31.6%)、一方AmpC産生菌の検出率は国内産が23.3%、輸入食肉が5.3%と国内産鶏肉の方が高かった。耐性遺伝子型の解析からESBL産生菌は国産肉ではCTX-M型(50.0%)、TEM型(18.8%)が多く、輸入肉ではCTX-M型(86.0%)が多かった。CTX-M型遺伝子として国内産はCTX-M2、輸入食肉はCTX-M2とCTX-M8/25が主に分離された。AmpC型遺伝子としてはCITが主に検出された。これら食肉から分離される多剤耐性腸内細菌科

細菌の9割以上は大腸菌であったが、病原性細菌であるサルモネラ属菌が1株検出された。VREについては、今年度は高度バンコマイシン耐性のVanA型やVanB型VRE株は国内外の鶏肉検体からは検出されなかった。しかし、新規のVanN型VREが国内産鶏肉1検体から検出された。VanN型株のPFGE解析とMLST解析から、この株は過去に分離された国産鶏肉由来VRE株と同一の起源であった。

D. 考察

1) WHO対応：

H28年度に作成しているGLASS用の集計プログラムに基づき報告の必要性がある。2014年、2015年のJANISデータを用いてGLASSが報告を求めている項目の集計を行って、プログラムの不具合を確認、修正を行った後に集計データをWHOに提出することになるであろう。JANIS及びJVARMには食品由来薬剤耐性菌の情報は含まれないことから、環境―動物―食品―ヒトを包括するワンヘルス・アプローチにおいて、地研における食品由来菌の耐性データは重要である。また、ヒト便検体由来サルモネラ株の耐性データについても、JANISのデータは少なく地研での集積が大きいと言われている。JANIS及びJVARMは、それぞれ病院及び動物由来耐性菌データベースであるが、地研での薬剤耐性菌の情報はデータベースとして一元化されていない。今後、三者のデータをナショナルサーベイランスとして統合するためには、すでに開発が進められているJANIS-JVARM相互変換ソフトを参考に地研データフォーマットを作成し、JANISに構築されたサブシステムに地研データを格納する等のシステムの開発が必要である。

2) 交差汚染；

ブロイラーの糞便からのCTX耐性頻度は低下傾向にある。おそらくブロイラーに投与しているセフトチオフルの中止の結果、選択圧が低下してきているためであろう。しかし、市販の国産鶏肉のCTX耐性頻度は依然として高い。その原因の一つとして、食肉処理場における交差汚染の影響が考えられよう。食鳥処理場においては、食肉処理場における交差汚染の状況を詳細に検査し、対策を検討する必要がある。特に、現状の実施状況を聞き取るとともに、7部位（モモ、ムネ、ササミ、手羽先、手羽元、レバー、砂肝）別に製品の耐性菌の汚染を定量的に検査し、汚染状況に基づいて優先順位をつけるとともに処理工程の問題を明らかにする必要がある。これらの情報は、農場から出荷以降の薬剤耐性菌の衛生管理に資するであろう。農場から食品に至る耐性菌の伝播状況とその伝播要因を明らかにすることで、科学的根拠を伴った適正なリスク管理オプションの選択及びその実効性の予測が重要であろう。

3) コリスチン耐性：

市販食肉を対象に、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子（*mcr-1*）陽性大腸菌の検出を試みた結果、鶏肉55検体中8検体（14.5%）、豚肉49検体中1検体（2.0%）が*mcr-1*を保有していた。今回の調査から、*mcr-1*保有大腸菌が広く市販食用肉にも分布していることが明らかとなった。今後も、薬剤耐性菌分離状況を経時的に注意深く観察していく必要がある。特に、コリスチンがCRE患者に使われてくる可能性がある。ヒト由来株におけるコリスチン耐性及び*mcr-1*遺伝子の保有状況について調査し、その結果を臨床現場に還元していく必要がある。

4) JANISとJVARMでの測定薬剤の薬剤感受性の相関：

PIPCに対するABPCについて相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、耐性性の検出及び比較に有効であると考えられたMINOに対するOTCについて、相関係数及び感度は良好な値を示したが、特異度が若干低く、耐性の検出には有効であるが、比較の際には注意が必要と考えられた。AMKに対するKMについて相関係数が低く、比較に用いるには検討が必要と考えられた。耐性遺伝子検出の結果から、保有する耐性遺伝子により、KM耐性であってもAMKのMICが上昇せず感受性になる可能性が考えられた。健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法およびE-testによるコリスチン最小発育阻止濃度を比較した結果、E-testによるMICは寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し、低い傾向が認められた。寒天平板希釈法は微量液体希釈法と比較し、MICがやや高い株が認められたものの、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、共にモニタリングに有用であることが確認された。これらにより、ほとんどの抗菌薬についてJANIS、JVARMの結果の相互比較が可能となり、今後有用な解析を行うことができるようになった。

E. 結論

JVARMとJANISで得られてデータの相互比較が可能となった。その結果、JVARMとJANISで測定薬剤の異なるフルオロキノロン系抗菌剤及び第3世代セファロスポリンについて、いずれの薬剤においても高い相関が認められたことから、上述したヒト臨床分離株と家畜由来株の耐性率の推移の違いは、測定薬剤が異なることが影響しているのではなく、薬剤耐性率の推移の違いを反映していることが確認された。今後は、それぞれにおいての実際の薬剤使用量と耐性率との相関を見る必要がある。第3世代セファロスポリンに対しては、ヒト臨床分離株では継続的な耐性率の上昇が認められているが、ブロイラーにおいては2010年以降耐性率が急激に低下してきている。その原因として農家がセフトチオフルの鶏への投与を自主的に中止した時期と一致しており、選択圧が取り除

かれた影響と考えられた。しかし、市販の鶏肉から分離される菌の耐性率はかなり高い。食鳥処理場や小売店での交差汚染が考えられる。今後その実態把握を行い、科学的な対処方法を提示していくことが必要であろう。コリスチンの耐性菌が食品等から分離されてきている。ヒトからの実態調査が必要であろう。地方衛生研究所を中心としたサルモネラの耐性菌情報は JANIS から得られる情報を補完するものであることが判明した。このデータを JANIS サーバーに取り込み、GLASS への報告に用いる体制が整いつつある。

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

G. 健康危険情報

家畜環境中の多剤耐性菌が食肉を介してヒトに伝播する可能性が示唆された。また、食鳥処理場や小売店での交差汚染が耐性菌の伝播に影響している可能性がある。食肉（生肉）の取り扱いには注意が必要である。

H. 研究発表
別紙に記載。

平成28年度食品の安全確保推進研究事業

「食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究」

分担課題名：家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARMとJANISの連携について

分担研究者：川西 路子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：木島 まゆみ（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：小澤 真名緒（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：内山 万利子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：白川 崇大（農林水産省動物医薬品検査所）

研究要旨

薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」が項目として記載されている。本研究では当該データの連携を実施するため、①厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）集計用プログラムを一部改変し移植した動物由来薬剤耐性菌モニタリング（JVARM）データサーバーに、JVARMの農場由来（平成26年～27年）及びと畜場由来（平成24～26年度）大腸菌について、データの入力作業を実施し、アンチバイオグラムを作成した。また、②JANISで測定されるヒト用の薬剤とJVARMで測定される動物用の薬剤の薬剤耐性の相関を確認するため、JANISの調査薬剤（ミノサイクリン；MINO、ピペラシリン；PIPC、アミカシン；AMK）の微量液体希釈法による最小発育阻止濃度（MIC）と、それぞれと同系統のJVARMの調査薬剤（オキシテトラサイクリン；OTC、アンピシリン；ABPC、カナマイシン；KM）の寒天平板希釈法によるMICを相関係数等によって比較し、関係について検討した。ABPCについては、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、PIPCとのMICの比較に用いられると考えられた。OTCについては特異度が低く、MINO耐性の検出には有効であるが、比較の際は注意が必要と考えられた。KMについては相関係数が低く、AMKとの比較に用いるには検討が必要であることが確認された。さらにヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチンについて、薬剤感受性試験法であるE-test、微量液体希釈法、寒天平板希釈法の3法によるMICの相関を検討した。E-testにおけるMICは寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し、低い傾向が認められた。寒天平板希釈法は微量液体希釈法と比較し、MICがやや高い株が認められたものの、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、共にモニタリングに有用であることが確認された。

A. 研究目的

家畜に由来する薬剤耐性菌が畜産食品を介して人に伝播し、人の健康に危害を与える可能性について評価するため、国内では動物由来薬剤耐性菌モニタ

リング（JVARM）が構築されている。

一方、医療の分野においては、医療機関における院内感染の発生状況、薬剤耐性菌の分離状況および薬剤耐性菌による感染症の発生状況を調査すること

で、我が国の院内感染の概況を把握し、医療現場への院内感染対策に有用な情報の還元等を行うことを目的に、厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）が構築されている。

本研究では、薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略 2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」のため、JVARM データの整備作業を継続した。JANIS では平成 26 年度にアンチバイオグラムを作成するための SIR の基準値が CLSI2007 から CLSI2012 に変更され、CLSI2007 と CLSI2012 の基準の SIR に基づくアンチバイオグラムが並列で公表されている。昨年度まで JVARM 由来株について CLSI2007 の SIR 基準に基づきアンチバイオグラムを作成していたが、JANIS のアンチバイオグラムと比較するために、CLSI2012 の基準の SIR に基づくアンチバイオグラムを作成することとした。また、平成 24 年から開始したと畜場由来株についてもアンチバイオグラムを作成した。

さらに、JVARM と JANIS では測定薬剤が一部異なるため、JVARM と JANIS のデータを比較可能か検討するため、テトラサイクリン系、ペニシリン系、アミノグリコシド系各薬剤間の薬剤感受性の相関を確認することとした。

またヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチン（CL）について、JANIS では微量液体希釈法により感受性が確認されているが、JVARM では平成 21 年まで薬剤感受性試験を寒天平板希釈法で実施していた。薬剤感受性の推移を JVARM 内及び JANIS と比較可能か検討するため、E-test、微量液体希釈法、寒天平板希釈法での最小発育阻止濃度（MIC）の相関を確認した。

B. 研究方法

(1)家畜由来大腸菌のアンチバイオグラムを

CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準により作成

平成 26～27 年度農場由来大腸菌及び平成 24 年～25 年と畜場由来大腸菌の MIC データを加工し、

JANIS 集計用プログラムを一部改変し移植した JVARM データサーバーに入力した。CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準によるアンチバイオグラムを作成した。

(2) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認

平成 21 年に JVARM において健康家畜から分離された大腸菌について、JVARM の調査薬剤（オキシテトラサイクリン；OTC、アンピシリン；ABPC、カナマイシン；KM）の寒天平板希釈法による MIC と、それぞれと同系統の JANIS の調査薬剤（ミノサイクリン；MINO、ピペラシリン；PIPC、アミカシン；AMK）の微量液体希釈法による MIC を、相関係数（スピアマン）、感度及び特異度を計算し、相関性について検討した。さらに、相関性が低かった成分について、その原因を検討するため耐性遺伝子の検出を行った。

(3) 健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度の比較

平成 22～26 年度に JVARM において健康家畜糞便から分離された大腸菌 126 株（牛由来：34 株、豚由来：37 株、肉用鶏由来：32 株、採卵鶏由来：23 株）を供試株とし、寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test を用いて CL の MIC を測定した。EUCAST での CL のカットオフ値 4μg/mL を用い、各方法での MIC を相関係数等によって比較し、関係について検討した。

C. 研究結果

(1)家畜由来大腸菌のアンチバイオグラムを

CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準により作成

平成 26～27 年度農場由来大腸菌及び平成 24～25 年と畜場由来大腸菌のアンチバイオグラムを CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準により作成する（図 1～7）とともに、動物医薬品検査所 HP（http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html）に掲載した。

(2) JANIS と JVARM での測定薬剤の相関の確認

相関係数、感度及び特異度はそれぞれ以下のとおりであった。MINO に対する OTC：0.739、1、0.64。PIPC に対する ABPC：0.709、1、0.899。AMK に対する KM：0.241、1、0.873（図8～10）。AMK に対する KM の相関係数が低かったが、特に KM の MIC が 128 µg/mL 以上の株において、AMK の MIC との差が大きくなっていた。特異度が低かった OTC と MINO、相関係数が低かった AMK と KM について、それぞれに耐性を示した株で耐性遺伝子の検出を行ったところ、OTC のみ耐性の株は 31 株中 24 株（77.4%）が tet(A)を、OTC と MINO 耐性の株は 18 株中 16 株（88.9%）が tet(B)を保有していた。また、KM のみ耐性の株は調査した耐性遺伝子 6 種類のうち 0～3 種類を保有していたが、AMK 耐性の 1 株（MIC 64 µg/mL）は 4 種類を保有していた（図 11）。

(3) 健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度の比較

E-test における MIC は寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し低い傾向が認められた。相関係数（スピアマン）、感度および特異度は、微量液体希釈法に対する E-test：0.684、0.806、0.958。寒天平板希釈法に対する E-test：0.819、0.674、1.000。寒天平板希釈法に対する微量液体希釈法：0.801、0.721、1.000（図 12～14）であった。

D. 考察

JVARM の農場及び畜場由来の大腸菌について CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準によるアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP に掲載した。JVARM と JANIS の比較可能なデータを公表し、両者の連携を継続的に実施した。これまで大腸菌についてアンチバイオグラムを作成していたが、本研究班において、食品由来株については、全国の地方衛生研究所において収集されたサルモネラについてモニタリングを開始されたことから、家畜由来株と食品由来株の連携を図るためには、サルモネラについて来年度以降アンチバイオグラムを作成する必要があると考えられる。

JANIS と JVARM での測定薬剤の薬剤感受性の相関を確認した結果、PIPC に対する ABPC について相

関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、耐性の検出及び比較に有効であると考えられた MINO に対する OTC について、相関係数及び感度は良好な値を示したが、特異度が若干低く、耐性の検出には有効であるが、比較の際には注意が必要と考えられた。AMK に対する KM について相関係数が低く、比較に用いるには検討が必要と考えられた。耐性遺伝子検出の結果から、保有する耐性遺伝子により、KM 耐性であっても AMK の MIC が上昇せず感受性になる可能性が考えられた。

健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度を比較した結果、E-test による MIC は寒天平板希釈法および微量液体希釈法と比較し、低い傾向が認められた。寒天平板希釈法は微量液体希釈法と比較し、MIC がやや高い株が認められたものの、相関係数、感度、特異度ともに良好な値を示し、共にモニタリングに有用であることが確認された。なお、JVARM で平成 12～24 年に収集した 9,308 株の菌株について平成 21 年までは寒天平板希釈法で、平成 22 年以降は微量液体希釈法で CL の感受性試験を実施した結果を図 15 に示す。図に示す様に MIC2 µg/mL 以上の株の割合は増加傾向が認められておらず、家畜での CL の薬剤感受性上昇傾向は認められていない。来年度以降も CL 耐性については微量液体希釈法によりモニタリングを継続し、薬剤感受性の推移を確認していく予定である。

E. 結論

大腸菌について、CLSI2007 及び CLSI2012 の SIR 基準によりアンチバイオグラムを作成し動物医薬品検査所 HP に掲載した。ペニシリン系について、JANIS と JVARM での測定薬剤との薬剤感受性に高い相関があることを確認し、両モニタリングで実施された薬剤の耐性率の比較が可能であることを示した。テトラサイクリン系について OTC は MINO 耐性の検出には有効であるが比較の際には注意が必要、アミノグリコシド系の両薬剤については比較に用いるには検討が必要であることが確認された。コリスチン最小発育阻止濃度を寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test で比較し、E-test は MIC 値

が低い、いずれの試験方法も相関係数、感度および特異度について良好な値を示し、CL 耐性率のモニタリングに有用であることが確認された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Suzuki, S., Ohnishi, M., Kawanishi, M., Akiba, M., and Kuroda, M. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis* 16, 284-285(2016)
- (2) Makita, K., Goto, M., Ozawa, M., Kawanishi, M., Koike, R., Asai, T., and Tamura, Y. Multivariable Analysis of the Association Between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Apparently Healthy Pigs in Japan. *Microb Drug Resist* 22, 28-39(2016)
- (3) Ozawa, M., Hiki, M., Kawanishi, M., Abo, H., Kojima, A., Asai, T., and Hamamoto, S. Molecular Typing of Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter jejuni* Isolated from Broilers in Japan Using Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Foodborne Pathog Dis* 13, 1-7 13. (2016)
- (4) Kawanishi, M., H. Abo, M. Ozawa, M. Uchiyama, T. Shirakawa, S. Suzuki, A. Shima, A. Yamashita, T. Sekizuka, K. Kato, M. Kuroda, R. Koike, and M. Kijima. Prevalence of colistin-resistance gene *mcr-1* and absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* isolated from healthy food producing animals in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*
- (5) Hiki M, Shimizu Y, Kawanishi M, Ozawa M,

Abo H, Kojima A, Koike R, Suzuki S, Asai, T, Hamamoto S. (2016) Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftiofur and third generation cephalosporins in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *J. vet. diagn. invest* (in press)

- (6) 川西路子 JVARМ(動物由来薬剤耐性菌モニタリング)の取り組み (2016) 日本豚病研究会会報 第68号
- (7) 川西路子 動物由来細菌薬剤感受性調査 (JVARМ) の概要と薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランへの対応 (2017) 日本獣医師会雑誌 1月号

2. 学会発表

- 1) 小澤真名緒、川西路子、内山万利子、阿保均、小池良治、木島まゆみ。家畜由来大腸菌における人用抗菌剤と動物用抗菌剤の最小発育阻止濃度 (MIC) の関係 第 159 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 8 日 神奈川
- 2) 内山万利子、小澤真名緒、川西路子、阿保均、小池良治、木島まゆみ。健康家畜由来大腸菌における寒天平板希釈法、微量液体希釈法および E-test によるコリスチン最小発育阻止濃度の比較 第 159 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 8 日 神奈川
- 3) 川西路子、阿保均、内山万利子、小澤真名緒、小池良治、木島まゆみ。健康家畜由来大腸菌におけるコリスチン耐性について 第 159 回日本獣医学会学術集会 2015 年 9 月 8 日 神奈川

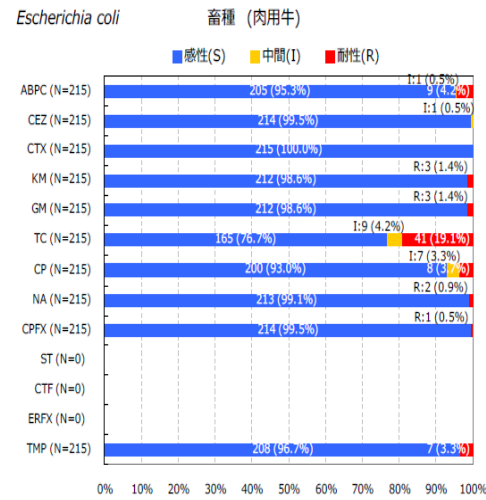
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

※ JVARМ事業を通して菌株の提供等ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の諸先生方に感謝いたします。

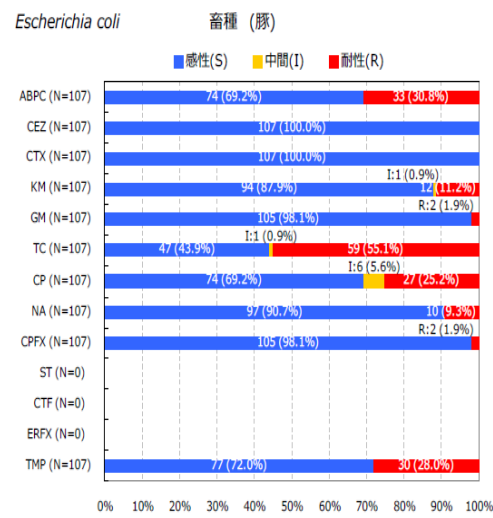
2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



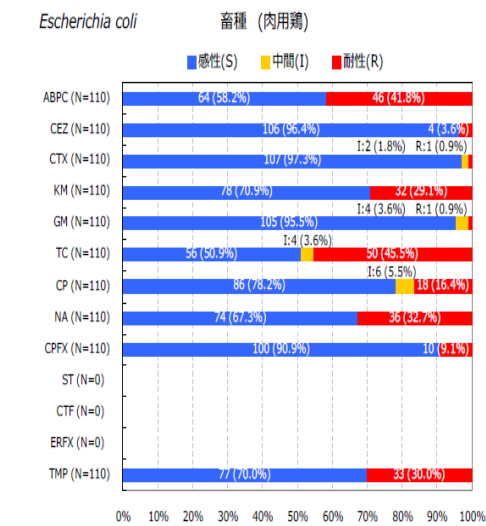
2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*

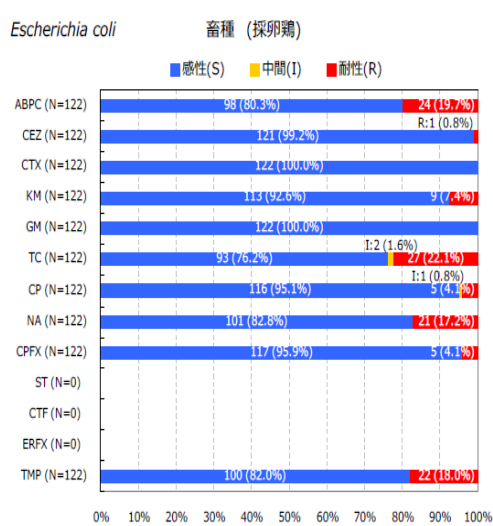
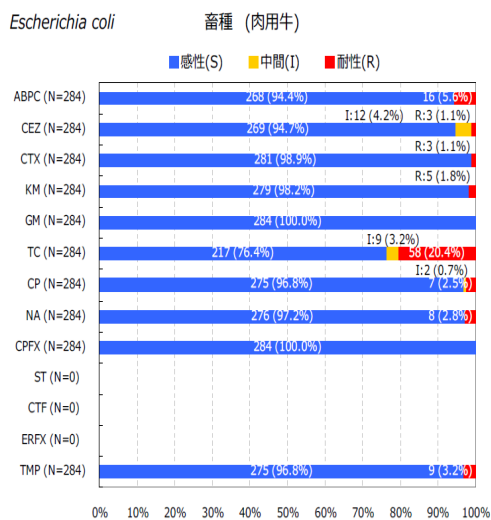


図 1. 2015 年 CLSI2007SIR 基準 JVARM 農場由来株のアンチバイオグラム

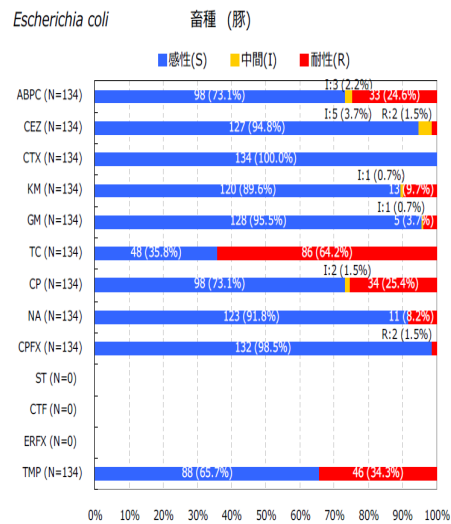
2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



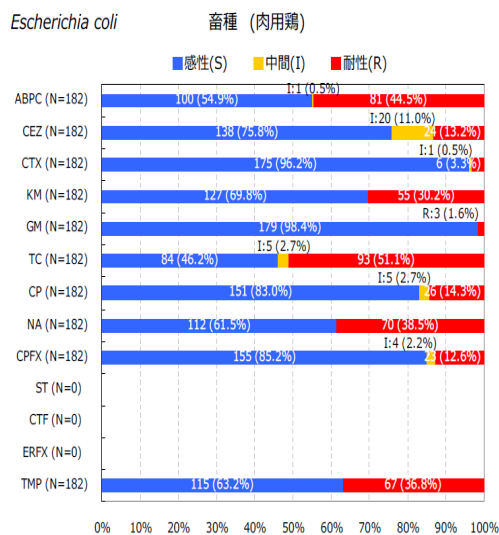
2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*

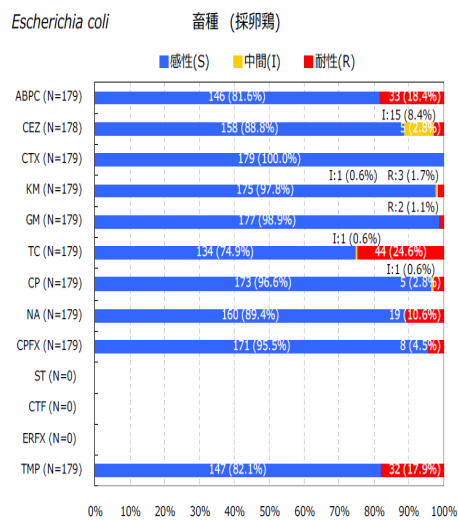
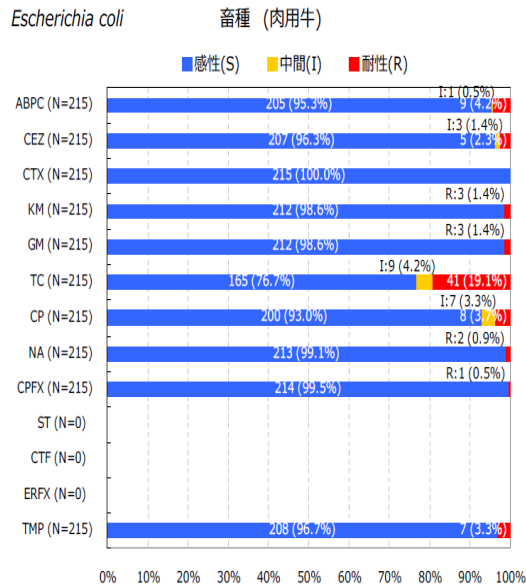


図 2. 2014 年 CLSI2012SIR 基準 JVARM 農場由来株のアンチバイオグラム

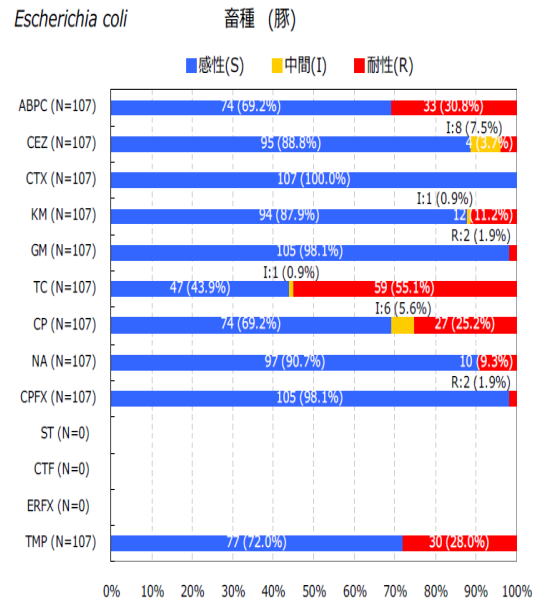
2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



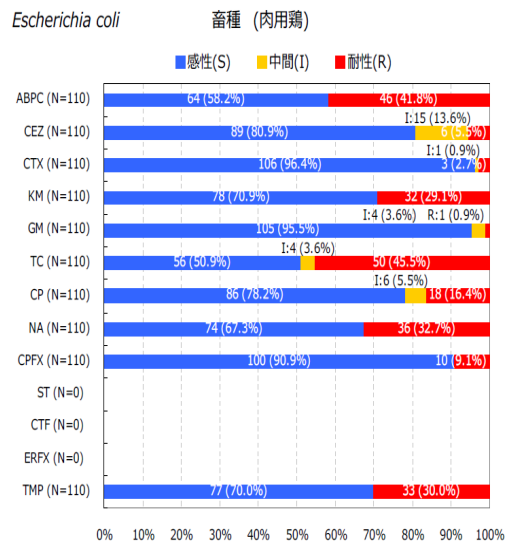
2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2015年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*

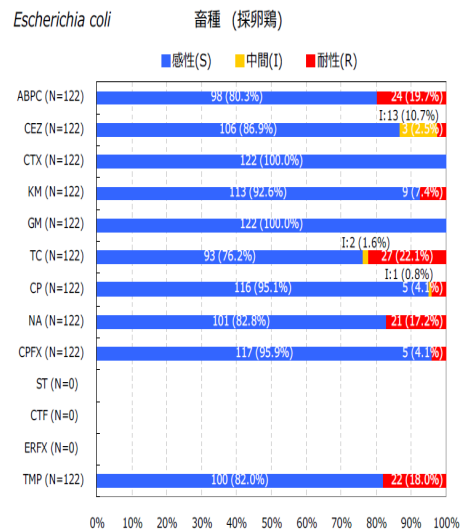
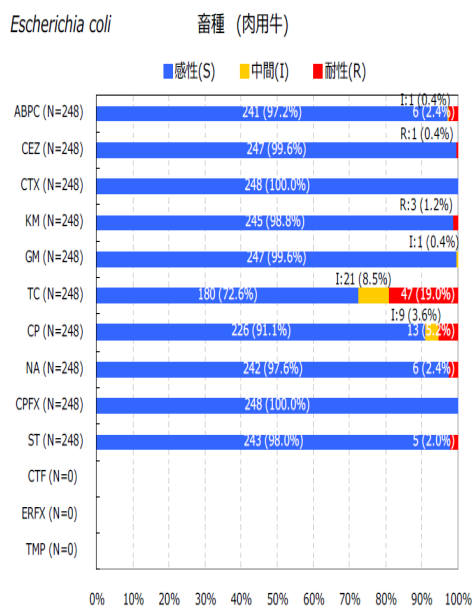


図3. 2015年 CLSI2012SIR 基準 JVARM 農場由来株のアンチバイオグラム

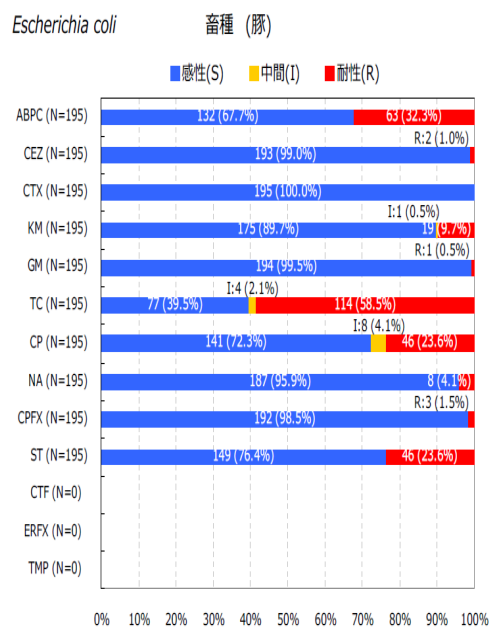
2012年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2012年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2012年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*

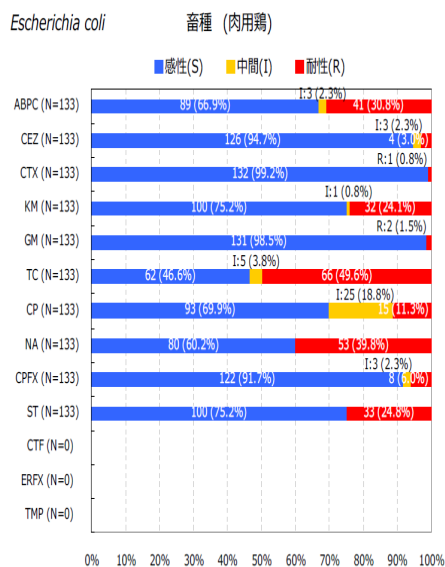
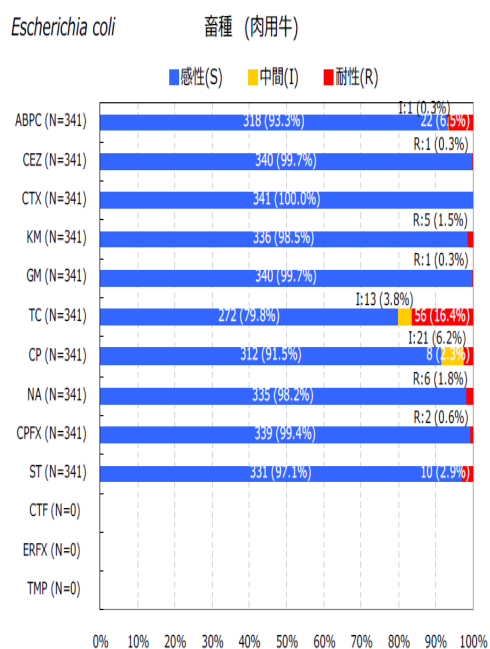


図 4. 2012 年 CLSI2007SIR 基準 JVARM と畜場由来株のアンチバイオグラム

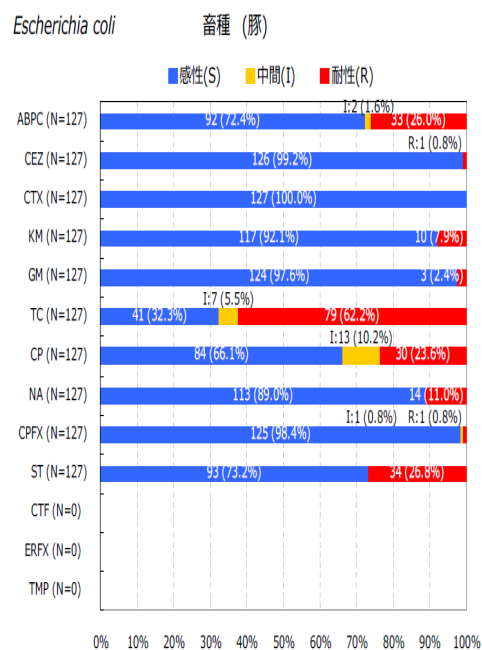
2013年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2013年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2013年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*

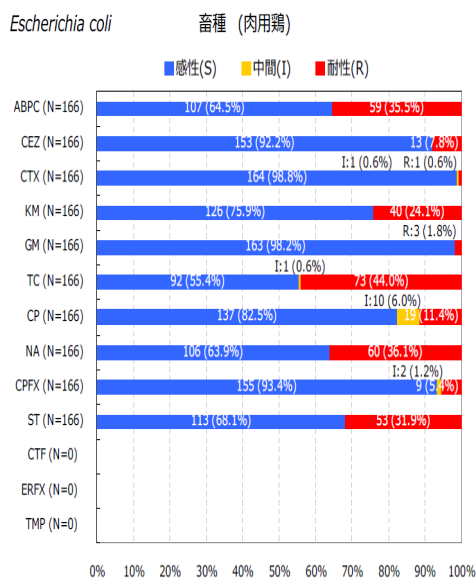
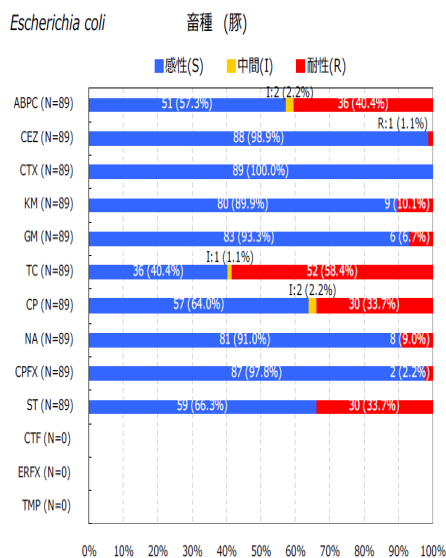


図5. 2013年 CLSI2007SIR 基準 JVARM と畜場由来株のアンチバイオグラム

2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*

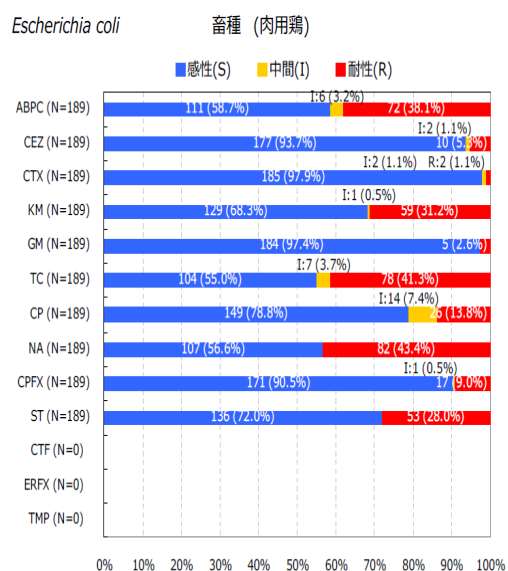
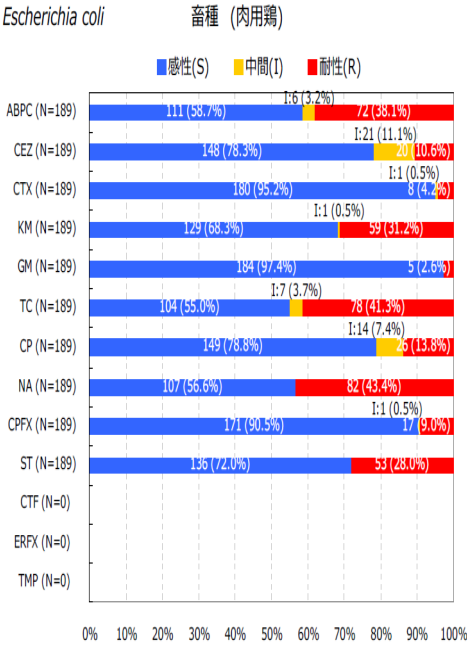


図 6. 2014 年 CLSI2012SIR 基準 JVARM と畜場由来株のアンチバイオグラム

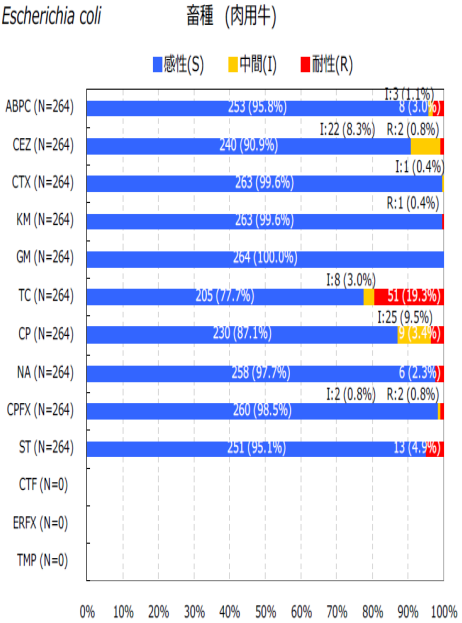
2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*



2014年

7. 主要菌の抗菌薬感受性*

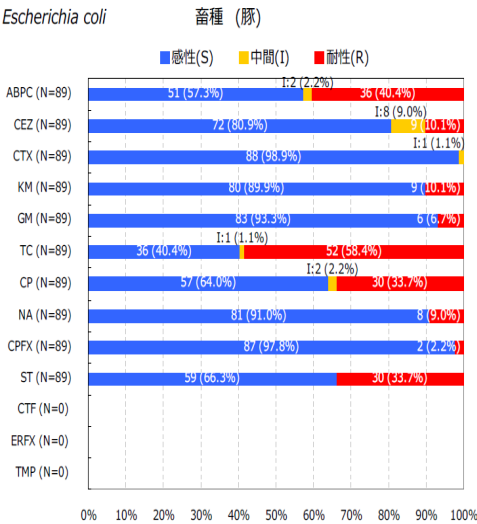


図 7. 2014 年 CLSI2007SIR 基準 JVARM と畜場由来株のアンチバイオグラム

結果: MINOとOTCの関係

寒天平板希釈法で測定したOTCのMIC (mg/L)	微量液体希釈法で測定したMINOのMIC (mg/L)								
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	総計
0.25			1						1
0.5			2		1				3
1			3	9	1				13
2			9	9	3	1			22
4			8	7					15
8				1					1
16		1							1
32						1			1
64				1					1
128					3	1	1		5
256				2	8	2	5	2	19
512				1	2	6	5	3	17
>512					2	1	1	1	5
総計		1	15	31	27	12	12	6	104

	MINO感受性	MINO耐性
OTC感受性	55	0
OTC耐性	31	18
総計	86	18

相関係数: 0.739

感度: 1 (18/18)

特異度: 0.64 (55/86)

図8. MINO と OTC の MIC の相関

寒天平板希釈法 で測定したABPC のMIC(mg/L)	微量液体希釈法で測定したPIPCのMIC (mg/L)												
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512	総計
0.5													
1		4	4	1									9
2		5	11	1									17
4		4	21	1									26
8	1	2	7	6									16
16			2	1									3
32													
64		1				1							2
128						1							
256		1	2										
512								1					
>512								1	4	2	6	7	20
総計	1	17	47	10		2	2	4	3	10	8		104

	PIPC感受性	PIPC耐性
ABPC感受性	71	0
ABPC耐性	8	25
計	79	25

相関係数: 0.709

感度: 1 (25/25)

特異度: 0.899 (71/79)

図9. PIPC と ABPC の MIC の相関

結果:AMKとKMの関係

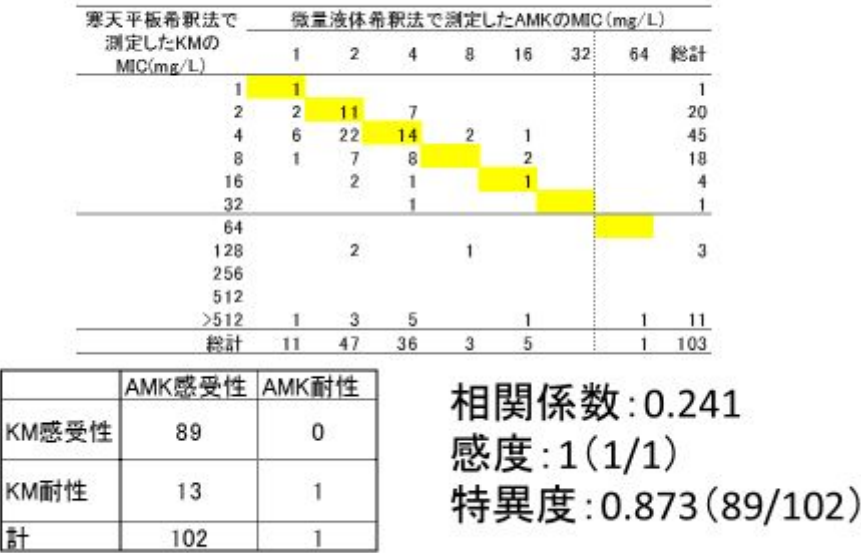


図 10. AMK と KM の MIC の相関

株	MIC (μg/mL)		アミノグリコシド耐性遺伝子					
	AMK	KM	strA	strB	aph(3')-lia	aac(3)-lia	aac(6')-lb	ant(3'')-la
21-Ec-C-67	1	>512	-	+	+	-	-	+
21-Ec-C-54	2	128	-	-	-	-	-	+
21-Ec-C-66	2	128	-	+	-	+	-	+
21-Ec-L-99	2	>512	-	+	+	-	+	-
21-Ec-P-43	2	>512	-	-	+	-	-	+
21-Ec-P-95	2	>512	-	-	+	-	-	-
21-Ec-C-28	4	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-C-70	4	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-C-89	4	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-L-44	4	>512	-	-	-	-	-	-
21-Ec-L-98	4	>512	-	+	+	-	+	-
21-Ec-C-53	8	128	-	-	-	-	-	-
21-Ec-P-91	16	>512	-	+	+	-	-	-
21-Ec-P-110	64	>512	-	+	+	-	+	+

図 11. KM 耐性株におけるアミノグリコシド耐性遺伝子

結果：微量液体希釈法とE-testの関係性

E-testによる MIC($\mu\text{g/mL}$)	微量液体希釈法によるMIC($\mu\text{g/mL}$)							
	≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	total
0.047	1	1	1					3
0.064		1	2	1				4
0.094	11	9	6	10	1	1		38
0.125	3	10	7		10			30
0.19	3	3	3	1				10
0.25								0
0.5								0
1								0
2					2	2		4
3					5	3		8
4					3	14		17
6					1	8		9
8						1	1	2
12						1		1
total	18	24	19	12	22	30	1	126

	微量液体希釈法 感受性	微量液体希釈法 耐性	
E-test感受性	91	6	
E-test耐性	4	25	
total	95	31	

感度 : 0.806 (25/31)
 特異度 : 0.958 (91/95)
 相関係数(Pearson): 0.824
 相関係数(Spearman): 0.684

図 12. コリスチンの微量液体希釈法と E-test の MIC の相関

結果：寒天平板希釈法とE-testの関係性

E-testによる MIC($\mu\text{g/mL}$)	寒天平板希釈法によるMIC($\mu\text{g/mL}$)							total
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	
0.047		3						3
0.064		4						4
0.094	1	36			1			38
0.125		26	3		1			30
0.19		10						10
0.25								0
0.5								0
1								0
2					3	1		4
3					6	2		8
4					5	12		17
6						9		9
8							2	2
12							1	1
total	1	79	3	0	16	24	3	126

	寒天平板希釈法 感受性	寒天平板希釈法 耐性	
E-test感受性	83	14	
E-test耐性	0	29	
total	83	43	

感度 : 0.674 (29/43)
 特異度 : 1.000 (83/83)
 相関係数(Pearson): 0.942
 相関係数(Spearman): 0.819

図 13. コリスチンの寒天平板希釈法と E-test の MIC の相関

結果: 寒天平板希釈法と微量液体希釈法の関係性

微量液体希釈法による MIC($\mu\text{g/mL}$)	寒天平板希釈法によるMIC($\mu\text{g/mL}$)							
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	total
≤ 0.125	1	17						18
0.25		24						24
0.5		16	2		1			19
1		12						12
2		10	1		7	4		22
4					8	20	2	30
8							1	1
total	1	79	3	0	16	24	3	126

微量液体希釈法	寒天平板希釈法		
	感受性	耐性	
感受性	83	12	感度 : 0.721 (31/43) 特異度 : 1.000 (83/83) 相関係数(Pearson): 0.843 相関係数(Spearman): 0.801
耐性	0	31	
total	83	43	

図 14. コリスチンの寒天平板希釈法と微量液体希釈法の MIC の相

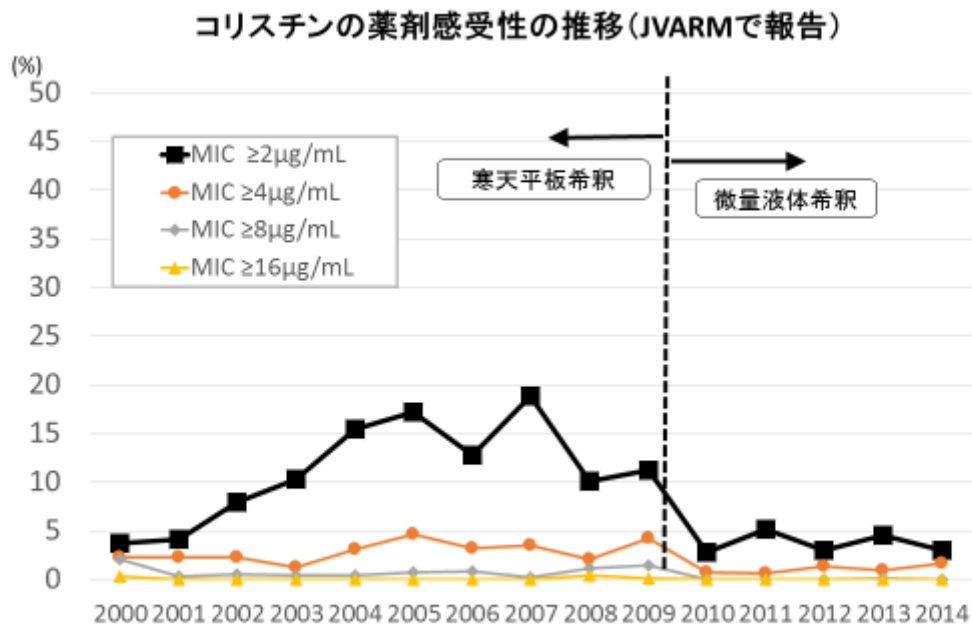


図 15. JVARM におけるコリスチンの薬剤感受性の推移

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 28 年度 分担研究報告書食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 家畜に由来する薬剤耐性菌が食品へ伝播する経路に関する研究

研究分担者 浅井 鉄夫（岐阜大学大学院連合獣医学研究科・応用獣医学・教授）
研究協力者 杉山 美千代（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）
研究分担者 Montira Yossapol（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）

研究要旨

この研究では、肉養鶏農場における薬剤耐性菌の抗菌薬投与後の変動と出現要因を調査した。さらに、食鳥処理場における薬剤耐性菌の制御方法を検討するため、食鳥処理過程での汚染状況を調査した。最初に、初生ヒナ導入 5～7 日にアモキシシリンと 25～27 日目に ST 合剤を投与する肉用鶏生産農場で、アンピシリン耐性とセファロスポリン耐性菌の動向について 2 鶏群を対象に調べた。糞便中の大腸菌に対するアンピシリン耐性大腸菌の割合は、アモキシシリン投薬後と ST 合剤投薬後に増加し、交差耐性と共耐性の影響で耐性菌が選択されていると考えられた。一方、セファロスポリン耐性菌は 1 鶏群のみで認められ、大腸菌 (CMY-2 と CTX-M-3) の他、CTX-M-3 型 ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* と *Enterobacter cloacae* であった。次に、肉用鶏農場でのセファロスポリン耐性菌の分布要因を検討するため、3 孵化場から導入したヒナの盲腸便におけるセファロスポリン耐性菌の汚染実態について数紙を用いて調査した。数紙 66 検体中、CTX-M-25 産生 *E. cloacae* が 4 検体及び CTX-M-25 産生 *K. pneumoniae* が 1 検体から分離され、導入鶏が農場での耐性菌分布に関与することが示唆された。最後に、鶏肉等で交差汚染が認められた食鳥処理場で、食鳥処理の各工程で使用された汚水の細菌検査を実施した。大腸菌は、内臓処理工程の汚水 2 検体のみで検出され、1 検体でセファロスポリン耐性大腸菌 (CMY-2) が分離された。汚水中の大腸菌に対する割合は、約 100 分の 1 であった。同日に処理された 2 個体の糞便からは、CMY-2 及び CTX-M-2G 産生大腸菌が分離された。

A. 研究目的

家畜由来の薬剤耐性及び耐性遺伝子が、食品を介してヒトの健康へ悪影響を与える可能性とその程度を科学的に評価するため、フードチェーンにおける情報の収集が重要な課題である。国内のプロイラーから分離される大腸菌やサルモネラにおいて、第 3 世代セファロスポリン耐性が 2004 年ごろから増加し、ワクチンを卵内接種する時にセフチオフル（動物用第 3 世代セファロスポリン製剤）を混合することが要因として指摘された。わが国において、2012 年にセフチオフル（動物専用、第 3 世代セファロスポリン）の卵内接種およびヒナへの使用に対して養鶏団体による自主的注意喚起が行われた以降、農場の鶏糞から ESBL/AmpC 産生大腸菌の出現率が減少した。しかし、市販鶏肉から第 3 世代セファロスポリン耐性菌は依然として分離されるため、肉養鶏から鶏肉処理過程での薬剤耐性菌の伝播状況を明らかにする必要がある。本研究は、①肉養鶏生産農場において、抗菌薬投与が薬剤耐性菌の同行に与える

影響を調査し、②導入鶏における第三世代セファロスポリン耐性菌の分布状況を明らかにし、③食鳥処理過程で薬剤耐性菌の分布に関する問題を明らかにして、科学的データに基づき畜産物の薬剤耐性菌対策を提案することを目的とする。

B. 研究方法

(1) 試験 1：肉養鶏農場における薬剤耐性菌の抗菌薬投与後の変動

5～7 日齢にアモキシシリン (20mg/L) と 25～27 日齢に ST 合剤 (sulfamonomethoxine 75mg/L + ormetoprim 25mg/L) を投与する岐阜県内の肉用鶏生産農場で、薬剤投与後のアンピシリン耐性とセファロスポリン耐性菌の動向について 2 鶏群を対象に調べた。

導入から出荷までの期間に、5、12、19、26、33 及び 40 日齢に 3～5 羽の糞便を採取した。滅菌生理食塩水を用いて、プールした糞便 1g を 10 倍段階希釈し、アンピシリン (AMP) 及びセファレキシム (CEX) を 50mg/L 添加した DHL 寒天培

地（栄研化学、栃木）及び薬剤非添加の DHL 寒天培地に希釈液 50 μ L を接種し、37°C で一晚培養した。薬剤添加及び非添加の DHL 寒天培地に認められた赤色コロニー数を測定し、糞便 1g 中の大腸菌数及び AMP または CEX 耐性数を求め、その割合を算出した。コロニーが認められた最高希釈の CEX 添加 DHL 寒天培地から、赤色の 5 コロニーを単離して、TSI 培地及び LIM 培地を用いて性状を確認した後、API20E（シスメックス・バイオメリュウ、東京）を用いて同定した。

（2）試験 2：肉養鶏農場における薬剤耐性菌の出現要因

異なる 3 箇所の孵化場から初生雛を導入する農場で、輸送箱の敷紙 66 サンプル（A 孵化場 38 サンプル、B 孵化場 7 サンプル、C 孵化場 21 サンプル）を採取し、検査材料とした。敷紙（25 cm²）を細切後、5ml の生食中で懸濁して、50 μ L を CEX 加 DHL 培地に接種し、培養した。同時に、敷紙（25 cm²）を CEX を 50mg/L 添加した MHB を用いて 37°C で一晚増菌培養後、同培地に接種した。発育したコロニーを単離して、TSI 培地及び LIM 培地を用いて性状を確認した後、API20E で同定した。

（3）試験 3：食鳥処理場における薬剤耐性菌の制御

予備実験として、昨年度の調査で、AmpC/CTX-M β -ラクタマーゼ産生大腸菌が確認された無薬鶏飼育農場の食鳥処理場で、鶏肉等が耐性菌に汚染しているかを調査した。食肉処理場で鶏肉等（肝臓、手羽先、手羽元、砂肝、ムネ肉、モモ肉、ササミ）を採材し、各部位 25cm² を綿棒でふき取り、DHL 培地及び CEX 加 DHL 培地に直接塗抹し、37°C で 1 晩培養した。分離菌はバイテック 2 コンパクトを用いて同定した。次に、食鳥処理工程の排水（脱羽排水、内臓検査排水①及び②、内外洗浄水、予備チラー水、本チラー水）6 サンプルを用い、前述した方法で、大腸菌数と CEX 耐性菌数を算出した。赤色の 5 コロニーを単離して、バイテック 2 コンパクトを用いて同定した。

（4）薬剤感受性試験

薬剤の最少発育阻止濃度（以下 MIC）は、Clinical Laboratory Standards Institute（CLSI）法に準拠したドライプレート「栄研」（栄研化学、栃木）を用いた微量液体希釈法により決定した。供試薬剤は、アンピシリン（ABPC）、CEZ、セフトキシム（CTX）、メロペネム（MEPM）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、テトラサイクリン（TC）、ナリジクス酸（NA）、シプロフロキサシン（CPFX）、コリスチン（CL）、クロラムフェニコール（CP）、

トリメトプリム・スルファメトキサゾール（ST）の 12 剤を用いた。

（5） β ラクタマーゼ型別

CTX 耐性株（MIC $\geq$ 4mg/L）は、PCase 試験と DDST 法によるスクリーニング後、Dallenne らのマルチプレックス PCR 法により β ラクタマーゼ産生遺伝子型を決定した。

（6）PFGE

PulseNet のプロトコールに準拠して実施した。

（倫理面への配慮）

配慮すべき倫理面の問題はない。

C. 研究結果

（1）試験 1

大腸菌数は 10⁶~10⁸CFU/g で推移した。糞便中の大腸菌に対するアンピシリン耐性大腸菌の割合は、アモキシシリン投薬後と ST 合剤投薬後に増加した（図 1）。また、ST 合剤耐性を除くその他の薬剤耐性は、ST 合剤投薬後に認められなかった（図 2）。一方、セファロsporin 耐性菌は 1 鶏群のみで認められ、薬剤投与の影響は認められなかった。大腸菌（CMY-2 と CTX-M-3）の他、CTX-M-3 型 ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* と *Enterobacter cloacae* であった（表 1）。

（2）試験 2

3 孵化場から導入したヒナの盲腸便におけるセファロsporin 耐性菌の汚染実態について敷紙を用いて調査した。A 孵化場由来敷紙 38 検体中、1 検体（2.63%）から CTX-M-25 産生 *K. pneumoniae*、もう 1 検体（2.6%）から CTX-M-25 産生 *E. cloacae* が分離された。B 孵化場由来敷紙 7 検体中 2 検体（28.6%）から、また、C 孵化場由来 21 検体中 1 検体（4.8%）から CTX-M-25 産生 *E. cloacae* が分離された（表 2）。分離した CTX-M-25 産生 *E. cloacae* 4 株は、農場ごとに異なる PFGE 型を示した。接合伝達試験により得られた接合伝達株は、 β -ラクタム耐性の他、カナマイシン耐性を示した。

（3）試験 3

昨年度の調査で、無薬鶏群と有薬鶏群の両郡でセファロsporin 耐性大腸菌が継続的に分離されたことから、食鳥処理場における交差汚染が懸念された。そこで、食鳥処理の各工程で使用された汚水の細菌検査を実施した。大腸菌は、内臓処理工程の汚水 2 検体のみで検出され、1 検体でセファロsporin 耐性大腸菌（CMY-2）が分離された。

汚水中の大腸菌に対する割合は、約 100 分の 1 であった。同日に処理された 2 個体からは、CMY-2 及び CTX-M-2G 産生大腸菌が分離された（図 3）。

D. 考察

昨年度実施した調査で、有薬（アモキシシリン投与）飼育鶏 1 群で継続的にセファロスポリン耐性大腸菌が認められ、選択圧としてセファロスポリン耐性大腸菌の分布に影響したと考えられた。しかし、今年度の結果から、アモキシシリン投薬による選択圧は、アンピシリン耐性の増加に影響するが、セファロスポリン耐性を増加させなかった。したがって、セファロスポリン耐性は、アモキシシリン投薬の影響を受けないと考えられた。アンピシリン耐性は、アモキシシリン投薬後と ST 合剤投薬後に増加した。これは、共耐性が影響したと考えられる。しかし、鶏の糞便には ST 耐性を含む多剤耐性型の大腸菌が存在していたが、ST 合剤投与後 ST-AMP 耐性が選択された理由は不明である。

今回認められた CTX-M-3 産生菌については、大腸菌、*K. pneumoniae* 及び *E. cloacae* の 3 菌種が認められた。飼育期間中に耐性因子の伝播について明らかにするため、保有するプラスミドの性状比較を実施する必要がある。

今年度の調査で、導入ヒナがセファロスポリン耐性菌及び耐性因子を伝播することが明らかとなった。導入ヒナにおけるセファロスポリン耐性菌は、分離頻度は低いが、全て同じ CTX-M-25 産生株であった。調査した 3 孵化場由来 *E. cloacae* は、PFGE 型が異なり、保有する耐性因子は、農場ごとに異なる可能性が示唆された。

CTX-M 型遺伝子の腸内細菌間及び食中毒菌への伝播及び拡散は、公衆衛生上重要な課題である。CTX-M-25 保有プラスミドは、大腸菌へ接合伝達したことから、当該農場由来サルモネラ保存株（現在約 3000 株保有）の薬剤感受性試験を実施して、耐性遺伝子の伝播状況について明らかにする必要がある。CTX-M-25 は、家畜では比較的新しいタイプの ESBL であり、耐性遺伝子に関する情報を整備して、今後の流行に備えることが大切である。

今年度は、食鳥処理場における交差汚染の概要を知るため、予備実験として 7 部位（モモ、ムネ、ササミ、手羽先、手羽元、レバー、砂肝）の耐性菌汚染状況を調べて、各工程で使用した汚水の検査を実施した。最終製品で耐性菌汚染が確認されている食鳥処理場においても、汚水の耐性菌汚染

は低度で、使用する水の消毒剤添加は適切に実施されていると考えられた。

予備実験では、耐性菌汚染状況は部位別に異なり、処理工程の違いが影響する可能性が考えられた。そこで、現状の実施状況を聞き取るとともに、7 部位各 20 サンプルを用いて定量的に検査し、汚染状況に基づいて詳細に調べて優先順位をつけるとともに処理工程の違いを明らかにする。

農場から食品に至る耐性菌の伝播状況とその伝播要因を明らかにすることで、科学的根拠を伴った適正なリスク管理オプションの選択及びその実効性の予測が可能になる。

E. 結論

薬剤耐性菌の伝播には、導入動物が関与し、その増加は、抗菌剤の使用による交差耐性や共耐性が関与している。

F. 健康危険情報

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

G. 研究発表

1. 論文発表

浅井鉄夫：耐性菌とは？養豚の課題は何？ Pig Journal 19(12):15-17, 2016. 平成 28 年 12 月 15 日 アニマルメディア社

2. 学会発表

浅井鉄夫 動物由来ESBL産生菌の現状と人へのリスク 動物用抗菌剤研究会・四学会合同事業セミナー「One Healthから見た耐性菌の現状と課題」（東京、平成28年8月28日）

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

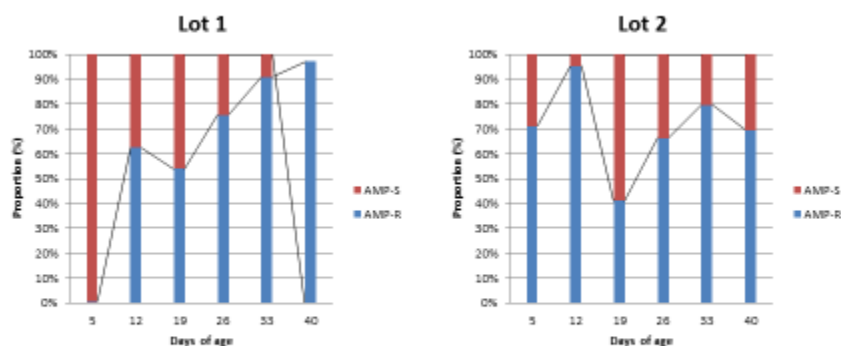
なし

2. 実用新案登録

なし

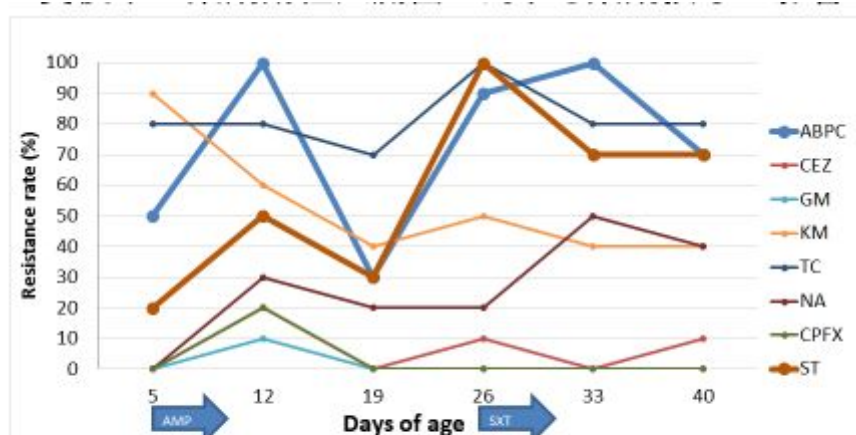
3. その他

なし



- 投薬
 - 5～7日アモキシシリン (20mg/L)
 - 24～26日 ST合剤(sulfamonomethoxine 75mg/L and ormetoprim 25mg/L)

図1 ブロイラーの糞便における飼育期間中のアンピシリン耐性大腸菌の推移 (%)



アンピシリン耐性の割合は、12日目と26日目以降に上昇した。
 ST耐性の割合は、26日目以降に上昇した。
 KM耐性の割合は、発育とともに減少した。
 TC耐性の割合は、70%以上で推移した。

図2 薬剤投与したブロイラーにおける薬剤耐性大腸菌の変動

表1 Lot 2 鶏群から分離されたセファロスポリン耐性腸内細菌

Days of age	Strain No.	Bacteria species	ABPC	CTX	GM	KM	TC	NA	CL	CP	ST	Multi [
5	CEX-1	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	8	64	8	≥ 64	4	0.25	≥ 128	19/1	CMY-2
	CEX-2	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	8	32	8	≥ 64	4	0.25	128	19/1	CMY-2
	CEX-3	<i>Enterobacter cloacae</i>	≥ 128	≥ 128	64	8	4	8	0.5	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 128	32	32	≥ 128	≥ 64	8	0.25	128	≥ 152/8	CTX-M-3
19	CEX-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	≥ 128	≥ 128	64	8	2	4	0.5	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-6	<i>Enterobacter cloacae</i>	≥ 128	≥ 128	≥ 64	8	2	16	≥ 16	8	≥ 152/8	CTX-M-3
33	CEX-24	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	≥ 128	64	≥ 128	≥ 64	32	2	≥ 128	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-25	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	≥ 128	≥ 64	16	≥ 64	≥ 128	0.5	4	≥ 152/8	CTX-M-3
40	CEX-14	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	≥ 128	≥ 64	≥ 128	≥ 64	≥ 128	0.5	16	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-15	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	≥ 128	32	≥ 128	≥ 64	≥ 128	1	16	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-16	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	≥ 128	≥ 64	16	≥ 64	≥ 128	0.5	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-17	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	≥ 128	≥ 64	16	≥ 64	≥ 128	1	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 128	≥ 128	32	8	≥ 64	16	1	≥ 128	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-19	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	≥ 128	64	8	≥ 64	≥ 128	0.5	8	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-20	<i>Escherichia coli</i> 1	≥ 128	≥ 128	≥ 64	16	≥ 64	≥ 128	1	4	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-22	<i>Enterobacter cloacae</i>	32	4	≤ 0.5	≥ 128	≥ 64	32	1	128	≥ 152/8	
	CEX-23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 128	≥ 128	64	4	4	4	1	64	≥ 152/8	CTX-M-3
	CEX-23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 128	≥ 128	64	4	4	4	1	64	≥ 152/8	CTX-M-3

表 2 初生雛から分離された ESBL 産生腸内細菌

Organisms	Strains	Hatcheries	β-lactamase types	MIC (μg/L) of antimicrobials									
				CTX ^a	MEPM	GM	KM	TC	NA ^b	CPFX	CL	CP	ST
				≥4 ^b	≥4 ^b	≥16 ^b	≥64 ^b	≥16 ^b	≥32 ^b	≥4 ^b	≥2 ^a	≥32 ^b	≥75/4 ^b
<i>K. pneumoniae</i>	CC57	A	CTX-M 25, SHV-11	64	≤0.25	2	≥128	≥64	4	≤0.05	1	2	19/1
<i>E. cloacae</i>	CC23	A	CTX-M 25, TEM-1	≥64	≤0.25	4	≥128	4	16	≤0.05	1	8	19/1
	CC5	B	CTX-M 25	≥64	≤0.25	32	64	4	2	≤0.05	2	8	38/2
	CC6	B	CTX-M-25	≥64	≤0.25	32	64	4	2	≤0.05	1	8	38/2
	CC32	C	CTX-M 25	≥64	≤0.25	≤0.5	≥128	2	4	≤0.05	≥16	8	9.5/0.5

^aCTX: ceftazidime, MEPM: meropenem, GM: gentamicin, KM: kanamycin, TC: tetracycline, NA: nalidixic acid, CPFX: ciprofloxacin, CL: colistin, CP: chloramphenicol and ST: sulfamethoxazole and trimethoprim; ^bCLSI Resistance breakpoint (μg/mL); ^cEUCAST Resistance breakpoint (μg/mL)



図3 食鳥処理場におけるセファロスポリン耐性菌の調査

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究 分担課題 全国地方衛生研究所において分離される薬剤耐性菌の 情報収集体制の構築

研究分担者

四宮博人

（愛媛県立衛生環境研究所）

研究協力者

渡邊涼太、小川恵子、森本 洋
武沼浩子、高橋洋平、武差愛美
小林妙子
小西典子
古川一郎、政岡智佳
太田 嘉、松本裕子、小泉充正
柳本恵太
綿引正則、内田 薫
東方美保
南 真紀、青木佳代、河野智美
若林友騎、原田哲也
橋田みさを、吉田孝子
角森ヨシエ、福岡藍子
調 恒明
清水裕美子、千神彩香
福田千恵美
木村俊也、仙波敬子、園部祥代、菅 美樹
藤田景清、有川衣美
甲斐明美

（北海道立衛生研究所）
（青森県環境保健センター）
（宮城県保健環境センター）
（東京都健康安全研究センター）
（神奈川県衛生研究所）
（横浜市衛生研究所）
（山梨県衛生環境研究所）
（富山県衛生研究所）
（福井県衛生環境研究センター）
（滋賀県衛生科学センター）
（大阪府立公衆衛生研究所）
（奈良県保健研究センター）
（島根県保健環境科学研究所）
（山口県環境保健センター）
（広島市衛生研究所）
（香川県環境保健研究センター）
（愛媛県立衛生環境研究所）
（北九州市環境科学研究所）
（国立感染症研究所）

研究要旨

全国の地方衛生研究所（以下、地研）の協力を得て（地域性等を考慮した 18 地研）、ヒト（有症者、大部分は便検体）及び食品（大部分は国産鶏肉）から、2015 年～2016 年に分離されたサルモネラ株 917 株の薬剤耐性状況を調査した。ヒト由来株（651 株）の 42.4%、食品由来株（266 株）の 89.8%が、1 剤以上の抗菌剤に耐性を示した。それぞれにおいて、2015 年分離株と 2016 年分離株はほぼ同じ耐性率を示し、現在の日本における状況を反映していると考えられる。多剤耐性状況については、ヒト由来株、食品由来株ともに 3 剤耐性が多かった。6 剤～10 剤に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 6 株、食品由来株中に 22 株認められた。また、それぞれ独立に採取したヒト由来株と食品由来株の間で、各種抗菌剤に対する耐性率に明瞭な類似性が認められたことから、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が示唆された。さらに、食品から分離された血清型と分離されなかった血清型別にヒト由来株の耐性率を比較すると、前者では 56.8%、後者では 19.1%と顕著な差違が認められ、この点でも食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。既存の薬剤耐性菌サーベイランスとして、ヒトを対象としたもの（JANIS）と動物を対象としたもの（JVARM）があるが、地研における食品由来薬剤耐性菌の情報をこれらのデータベースと統合し、総合的に解析する体制整備が必要である。

A. 研究目的

薬剤耐性(AMR)の問題は医療現場に限定されるものではなく、耐性菌は生態系で循環するとの考えが近年提示されている。こうした背景から、環境—動物—食品—ヒトなどを包括するワンヘルス・アプローチが重要であるという認識が共有され、WHOは2015年に「AMRに関するグローバルアクションプラン」を採択し、これを受けて、2016年4月に我が国においても「AMR対策アクションプラン」が策定された。このうち、動物については農林水産省で実施しているJVARM(Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)による耐性菌モニタリングシステムがあり、病院内の耐性菌については厚生労働省で行われているJANIS(Japan Nosocomial Infections Surveillance)によるサーベイランスがある。一方、食品由来耐性菌については、これらのシステムではモニターされていない。

昨年度の本研究分担班の調査で、地方衛生研究所(以下、地研)の多くが、食中毒起因菌等の食品由来細菌の薬剤耐性状況を調べていることが明らかにされた。今回、全国18地研の協力を得て、これらの地研において収集されているヒト(患者)由来及び食品由来細菌、特にサルモネラ属菌の薬剤耐性状況調査を、共通のプロトコル、薬剤、器材等を用いて実施した。このような統一された全国規模の調査は、本邦では初めてと思われる。また、得られたデータは、WHOグローバルアクションプランの一環として展開されている、GLASS(Global Antimicrobial Resistance Surveillance System)に報告する日本のデータベース構築にも活用される予定である。

B. 研究方法

1. 調査対象菌株

2015年及び2016年に、ヒト(患者)及び食品から分離され、サルモネラ属菌と判定された菌株を対象とした。ヒト由来株は、感染性胃腸炎や食中毒の患者検体から分離されたものを対象とし、検体情報として、性別、年齢、症状、検体の種類、分離年を可能な範囲で求めた。食品由来株は、分離した食品の種類、分離年月日を求め、食品が鶏肉の場合は、国産、輸入(国名)、不明の情報を記載した。食品由来株の内訳は、約90%が国産の鶏肉であった。

2. 薬剤感受性検査

協力18地研でサルモネラ属菌と判定された菌株を用い、末尾に添付した「渡邊班地研グループ薬剤感受性検査プロトコル」にしたがって、CLSIディスク拡散法による薬剤感受性検査を実施した。検査に用いる感受性ディスク等の試薬、ディスクディスペンサーやノギス等の器具は全ての地研で共通のものを用いた。寒天平板上の感受性ディスクの配置は、阻止円が融合しないよう、プロトコルに示す配置図のように配置した。結果の判定は、阻止円径を測定し、プロトコルの感受性判定表にしたがって行った。

3. 結果の報告と集計

サルモネラ株の検体情報、血清型(O抗原、H抗原)、感受性ディスク阻止円径、そのSIR判定結果を感受性検査結果表に記載後、研究分担者である愛媛県立衛生環境研究所に送付され、集計・解析された。なお、コリスチンについては、CLSIディスク拡散法のSIR判定表がないため、阻止円径のみを記載した。

倫理面への配慮

本研究課題は、分担者を研究代表者、協力地研担当者を研究協力者として、愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会で審査され、研究の許可が決定された。本審査にしたがい、全ての分離株及び調査情報は個人を特定できる情報を含まない状態で収集し、本研究に用いた。

C. 研究結果

1. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の血清型

収集されたサルモネラ株は、ヒト由来が651株(2015年388株、2016年263株)、及び食品由来株が266株(2015年156株、2016年110株)で、総計917株であった。これらのO血清群の内訳を図1に示す。ヒト由来では、O4が最も多く、次いで、O7、O8、O9の順に多かった。一方、食品由来株では、O4とO7が同程度に多く、次いでO8群の順で、この3つが主な血清群であり、そのほかの群は少数であった。H抗原を含めた血清型別の内訳でも、ヒト由来株は60種以上の血清型に型別されたが、食品由来株では20種類以下であった。これらのうち、ヒト由来株の上位10血清型及び食品由来株の上位5血清型を図2に示す。図中の「その他」についても大部分は型別されている。

2. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ

株の薬剤耐性状況

ヒト由来株 651 株のうち、調べた 18 剤の 1 剤以上に耐性を示した株は 276 株で、耐性率は 42.4% (2015 年 42.3%、2016 年 42.6%) であった (表 1)。一方、食品由来株 266 株のうち、239 株が 1 剤以上に耐性で、耐性率は 89.8% (2015 年 91.7%、2016 年 87.3%) と高い耐性率を示した。

ヒト由来株は有症者 (患者) から分離された菌株を対象としたが、糞便由来のものが最も多く 82.0% を占めた。その耐性率は 43.1% で、ヒト由来株全体の耐性率とほぼ同じであった (表 2)。検体別に見ると、血液由来株は耐性率が高い傾向であったが、尿、腹部ドレーンなどは糞便由来株と同程度であった。次に、ヒト由来株を患者年齢別に解析した。年齢区分は GLASS の報告様式にしたがった。年齢区分間で 33.3% ~ 48.6% の幅が認められたが、いずれの年齢でも全体平均の 42.4% に近い耐性率が認められた (表 3)。一方、食品由来株の食品別内訳を表 4 に示す。89.8% は国産鶏肉で、約 10% は外国あるいは不明の鶏肉、牛肉、豚肉であった。

3. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の多剤耐性状況

複数の薬剤に対する耐性状況について調べると、ヒト由来株では 1 剤と 3 剤耐性株が同程度認められたのに対し、食品由来株では 1 剤耐性株は比較的少なく、3 剤耐性株が最も多かった (図 3)。6 剤 ~ 10 剤に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 6 株、食品由来株中に 22 株認められた。ヒト由来の 6 株について表 5 に詳細を示す。

4. ヒト及び食品から分離されたサルモネラ株の各種抗菌剤に対する耐性率

抗菌剤別の耐性状況を図 4 に示す。ヒト由来株、食品由来株ともに、TC、SM に対する耐性率が最も高く、ABPC、KM、NA、ST、CP がそれらに続く耐性率であった。基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) 産生菌及び AmpC 型 β ラクターマーゼ (AmpC) 産生菌との関連が示唆される CTX、CAZ、CFX 耐性も数% 認められた。一方、アミノグリコシド系薬 GM、AMK、キノロン系薬 CFX、NFLX、ホスホマイシン系薬 FOM、カルバペネム系薬 IPM、MEPM に対する耐性率は低いか、0% であった。

全体として、ヒト由来株と食品由来株の 18 剤に対する耐性率に明瞭な類似性が認められた (図 4)。また、図 2 で示したヒト由来株の分

離数が上位 15 の血清型のうち、食品由来株としても分離されたものと分離されなかったものに分けて、耐性率を比較すると (表 6)、食品から分離された血清型と同じヒト由来株の耐性率は 56.8% であったのに対し、食品から分離されなかった血清型では 19.1% であった。

CTX、CAZ、CFX に耐性の株は、ESBL 産生菌及び AmpC 産生菌の可能性があるが、ヒト由来 9 株、食品由来 15 株が見いだされた。表 7 に示すように、これらの株の多くは 3 剤の複数に耐性を示した。

D. 考察

昨年度の本研究分担班の調査により、多くの地研において食中毒起因菌 (ヒト由来、食品由来) の薬剤耐性検査が実施されていることが明らかにされた。これを基に、地域性を考慮した 18 地研の協力を得て、ヒト (有症者、大部分は便検体) 及び食品 (大部分は国産鶏肉) から、2015 年 ~ 2016 年に分離されたサルモネラ株 917 株の薬剤耐性状況を調査した。ヒト由来株 (651 株) は 42.4%、食品由来株 (266 株) は 89.8% が、1 剤以上の抗菌剤に耐性を示した。それぞれにおいて、2015 年分離株と 2016 年分離株はほぼ同じ耐性率を示し、現在の日本における状況を反映していると考えられる。

ヒト由来株の血清型は非常に多様で 60 以上の型が含まれていたが、食品由来株は 5 種類の型が 85% を占め、ある程度限定された血清型が養鶏場等で定着している可能性が示唆された。また、ヒト由来株の耐性率は、どの患者の年齢 (0 歳 ~ 81 歳以上) においても 40% 前後を示した。一方、食品の約 90% は国産鶏肉で、分離株の耐性率は 92% であった。今回、外国産の食肉由来株が少なかったため比較できないが、国産でも高い耐性率を示すことが明らかにされた。

多剤耐性状況については、ヒト由来株、食品由来株とも 3 剤耐性が多かった。ヒト由来株では 1 剤耐性を示した分離株が多かったが、この中には、*S. Enteritidis* と *S. Saintpaul* が多くふくまれ (データは示していない)、これらの血清型は食品 (鶏肉) 由来株では少ないことが両者の相違の理由かもしれない。6 剤 ~ 10 剤に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 6 株、食品由来株中に 22 株認められた。ヒト由来株中に 10 剤耐性菌が 2 株認められ、抗菌剤耐性パターンは全く同じであったが、分離された地研は異なっている。この 2 株の疫学的背景やゲノム解析に興味を持たれる。

今回、それぞれ独立に採取したヒト由来株と

食品由来株の間で、各種抗菌剤に対する耐性率に明瞭な類似性が認められたことから、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が示唆される。さらに、食品から分離された血清型と分離されなかった血清型別に、ヒト由来株の耐性率を比較すると、前者では 56.8%、後者では 19.1%と顕著な差違が認められ、この点でも食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆される。また、ESBL 産生菌及び AmpC 産生株である可能性がある CTX、CAZ、CFX 耐性のヒト及び食品由来株については、より詳細な遺伝子解析等が望まれる。

JANIS 及び JVARM には食品由来薬剤耐性菌の情報は含まれないことから、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチにおいて、地研における食品由来菌の耐性データは重要である。また、ヒト便検体由来サルモネラ株の耐性データについても、JANIS のデータは少なく地研での集積が大きいと言われている。JANIS 及び JVARM は、それぞれ病院及び動物由来耐性菌データベースであるが、地研での薬剤耐性菌の情報はデータベースとして一元化されていない。今後、三者のデータをナショナルサーベイランスとして統合するためには、すでに開発が進められている JANIS-JVARM 相互変換ソフトを参考に地研データフォーマットを作成し、JANIS に構築されたサブシステムに地研データを格納する等のシステムの開発が必要である。

E. 結論

全国の地方衛生研究所（18 地研）で 2015～2016 年に分離されたヒト及び食品由来サルモネラ属菌（ヒト由来 651 株、食品由来 266 株、計 917 株）の薬剤耐性状況を 18 種類の感受性ディスクを用いて調べた。同一のプロトコル、試薬、器具、判定方法等を用いて全国規模で実施された本邦初の調査と思われる。その結果、42.4%のヒト由来株及び 89.8%の食品由来株が 1 剤以上の抗菌薬に耐性を示し、多剤耐性の割

合も高いことが判明した。ヒト由来株と食品由来株の各種抗菌薬に対する耐性率に明瞭な類似が認められた。これらのデータは、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチにおいて重要であり、JANIS、JVARM との三者のデータを統合するシステムの開発が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 菅 美樹、四宮博人、北尾孝司：市販鶏レバーおよび臨床材料から分離した基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* および *Klebsiella pneumoniae* が保有する *bla*_{CTX-M} 型別に関する検討. 感染症学雑誌 90(3):305-9, 2016

2. 学会発表

- 1) Keiko Semba, Mayumi Yamashita, Sachiyo Sonobe, Eiji Yokoyama, Tsuyoshi Sekizuka, Komei Shirabe, Makoto Kuroda, and Hiroto Shinomiya: Whole genome analysis of *Salmonella* isolates from foods and patients reveals their detailed relationships. シンポジウム 7 「ゲノム解析手法の最前線」、第 89 回日本細菌学会総会、2016.3.23-25、大阪
- 2) 園部祥代、仙波敬子、木村俊也、井上 智、四宮博人：愛媛県患者から分離されたペニシリン耐性肺炎球菌の血清型及び薬剤耐性遺伝子について. 第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会、2016.10.15-16、香川

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

渡邊班地研グループ薬剤感受性菌検査プロトコル

1 検査の項目

薬剤感受性試験

2 検体の種類・適用範囲

ヒト（有症者）および食品由来サルモネラ属菌と判定された菌株

3 検査法

CLSI ディスク拡散法

4 実施場所・作業環境

BSL2かつ管理区域内

5 検査に使用する試薬及び器具・器材等

1) 試薬・培地等

- ① 増殖用培地：トリプチケースソイブロス（TSB と略）
- ② 直接法用平板培地：ミューラーヒントンⅡ寒天培地（MH 寒天培地と略）
- ③ 感受性試験用培地：ミューラーヒントンⅡ寒天培地（市販の生培地）
- ④ 菌液調整用：滅菌生理食塩水
- ⑤ 感受性ディスク：BD センシ・ディスク
アンピシリン（ABPC）、セフトキシム（CTX）、ゲンタマイシン（GM）、カナマイシン（KM）、イミペネム（IPM）、ノルフロキサシン（NFLX）、シプロフロキサシン（CPFX）、ナリジクス酸（NA）、ST合剤（SXT）、メロペネム（MEPM）、セフトジジム（CAZ）、ホスホマイシン（FOM）、クロラムフェニコール（CP）、セフトキシチン（CFX）、アミカシン（AMK）、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、コリスチン（CL）

⑥ 薬剤感受性試験用標準菌株

Escherichia coli ATCC 25922（関東化学から購入可能）

2) 器具・器材等

- ① 白金耳、白金線
- ② センシ・ディスク・ディスペンサー
- ③ ノギス
- ④ 滅菌綿棒
- ⑤ 滅菌ピンセット
- ⑥ ふ卵器
- ⑦ マックファーランド Na0.5 標準比濁計（remel）

6 操作上の注意

1) 菌株について

前日に供試菌株をMH寒天培地に面線分離培養し、1種類の菌であることを確認した上で使用する。

2) 試薬について

室温に戻してから使用すること。

7 測定（操作）方法

1) 接種菌液の調整

接種菌液の調整は以下に示すいずれか一つの方法を用いる。

1) 増殖法

6.1)の菌株をTSBに接種し、マックファーランドNo.5以上の濁度になるまで35～37℃の条件で約2～6時間培養する。これを滅菌生理食塩水で希釈し、マックファーランドNo.5に調整する。

2) 直接法

6.1)の菌株（MH寒天培地上に発育した菌）を使用する。菌を直接滅菌生理食塩水に懸濁し、均一に懸濁されていることを確認後、マックファーランドNo.5に調整する。

2) 接種・培養

1) 調整菌液に滅菌綿棒を浸し、余液を試験管壁で取り除く。調整菌液は15分以内に使用すること。

2) MH寒天培地全面に塗布する。平板を約60°ずつ回転させた位置から、3回塗布する。この際、綿棒に菌液をつけるのは最初に行った1回だけでよい。静置時間は15分を超えないこと。

3) ディスクディスペンサーを用いてディスクを置く。15分以内に培地を逆さにし、35±2℃で16～18時間培養する。

ディスクディスペンサーのディスクの配置は図のようにする。

（ ディスクディスペンサーがない場合は、滅菌ピンセットを使ってディスクを置く。この場合ディスクの間隔を24mm以上離すこと。）

3) 測定

培養後、ディスク周辺に形成された阻止円直径をmm単位で測定する。

寒天培地を裏側にし、反射光で完全阻止円をノギスにより計測する。

4) 測定結果の判定法

測定された阻止円直径から別表感受性判定表により判定し、阻止円直径の計測値と感性（S）、中間（I）、耐性（R）の判定結果を別紙「渡邊班 薬剤耐性菌検査結果表」に記載する。なお、コリスチンについては阻止円直径の計測値のみの記載とする。

カテゴリーの解釈

感性：S（Susceptible）その抗菌薬の用法、用量により適切に治療できることが期待される。

中間：I（Intermediate）感性、耐性のどちらでもない。

耐性：R（Resistant）耐性菌。

別表

感受性判定表： サルモネラ属菌（2015 年、2016 年分）

感受性ディスク名	耐性 (R) ≤ (mm)	中間 (I) (mm)	感性 (S) ≥ (mm)	<i>E. coli</i> ATCC25922
アンピシリン (ABPC)	13	14-16	17	16-22
セフトキシム (CTX)	22	23-25	26	29-35
ゲンタマイシン (GM)	12	13-14	15	19-26
カナマイシン (KM)	13	14-17	18	17-25
イミペネム (IPM)	19	20-22	23	26-32
ノルフロキサシン (NFLX)	12	13-16	17	28-35
シプロフロキサシン (CPFX)	20	21-30	31	30-40
ナリジクス酸 (NA)	13	14-18	19	22-28
ST 合剤 (SXT)	10	11-15	16	23-29
メロベネム (MEPM)	19	20-22	23	28-34
セフトジジム (CAZ)	17	18-20	21	25-32
ホスホマイシン (FOM)	10	11-15	16	—
クロラムフェニコール (CP)	12	13-17	18	21-27
セフォキシチン (CFX)	14	15-17	18	23-29
アミカシン (AMK)	14	15-16	17	19-26
ストレプトマイシン (SM)	11	12-14	15	12-20
テトラサイクリン (TC)	11	12-14	15	18-25
コリスチン (CL)	—	—	—	11-17

*判定については感受性ディスク添付文書参照。

感受性ディスク配置図

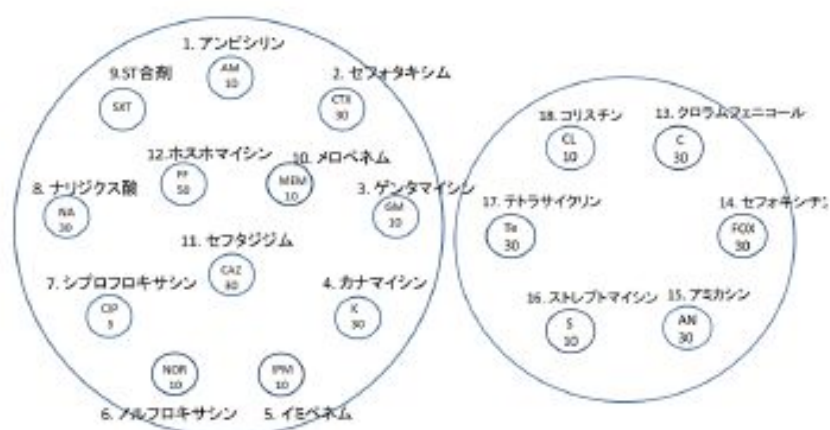


図1. ヒト及び食品由来サルモネラ株のO抗原別内訳

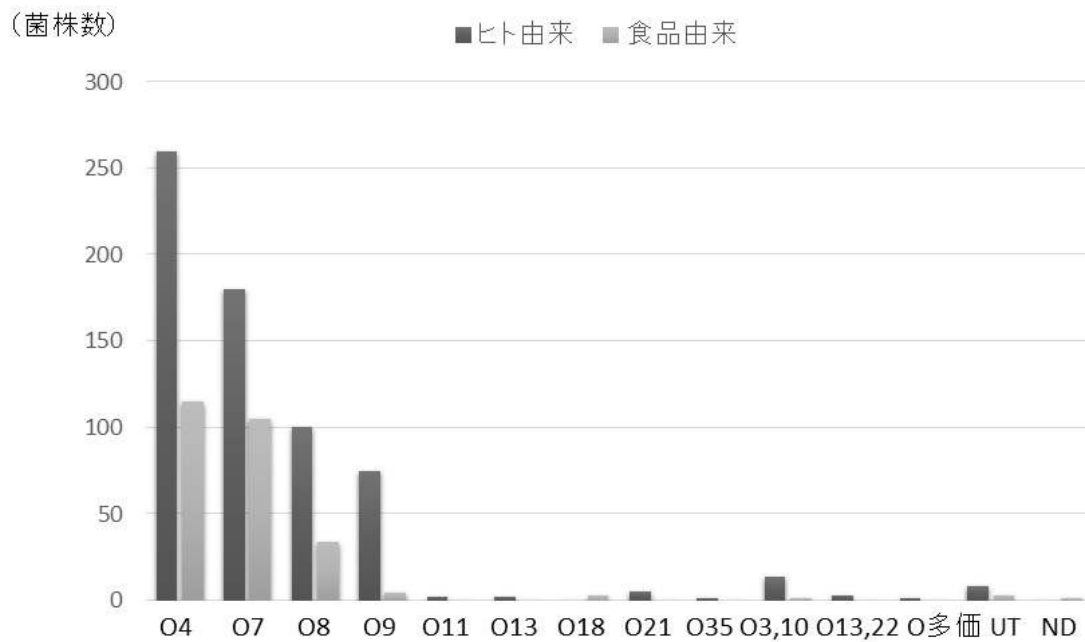


図2. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型

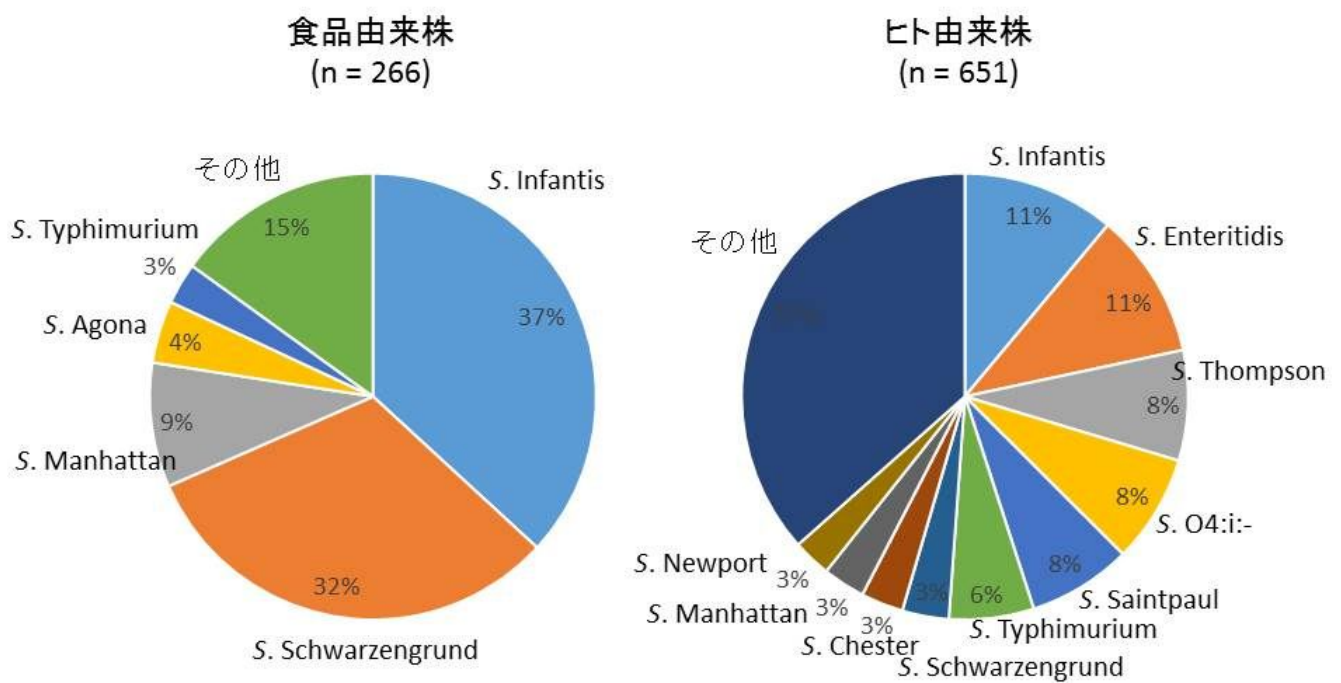


表1. ヒトび食品由来サルモネラ株の薬剤耐性状況
(2015, 2016年分離株, 総数917株)

由来	分離年	菌株数	耐性菌#	耐性率
ヒト由来	2015年	388	164	42.3%
	2016年	263	112	42.6%
	合計	651	276	42.4%
食品由来	2015年	156	143	91.7%
	2016年	110	96	87.3%
	合計	266	239	89.8%

#1剤以上の抗菌剤に耐性を示した菌株

表2. ヒト由来サルモネラ株の検体別内訳と耐性状況
(2015, 2016年分離株)

検体名	菌株数	耐性菌株数	耐性率
糞便	534	230	43.1%
血液	12	9	75.0%
尿	19	9	47.4%
腸壁・腹部ドレーン	2	1	50.0%
不明	84	27	32.1%
合計	651	276	42.4%

表3. ヒト由来サルモネラ株の年齢別菌株数及び耐性率
(2015, 2016年分離株)

年齢	菌株数	耐性菌株数	耐性率
0	12	4	33.3%
1～4	78	37	47.4%
5～14	161	64	39.8%
15～24	86	37	43.0%
25～34	70	34	48.6%
35～44	36	14	38.9%
45～54	24	11	45.8%
55～64	31	13	41.9%
65～80	48	22	45.8%
81以上	24	8	33.3%
不明	81	32	39.5%
合計	651	276	42.4%

表4. 食品由来サルモネラ株の食品別内訳と耐性状況
(2015, 2016年分離株)

食品名	菌株数	耐性菌株数	耐性率
国産・鶏肉	239	220	92.0%
タイ産・鶏肉	1	1	100%
アメリカ産・鶏肉	1	0	0%
不明・鶏肉	18	11	61.1%
国産・牛肉	2	2	100%
不明・牛肉	2	2	100%
国産・豚肉	3	3	100%
合計	266	239	89.8%

図3. ヒト及び食品由来サルモネラ株の多剤耐性状況

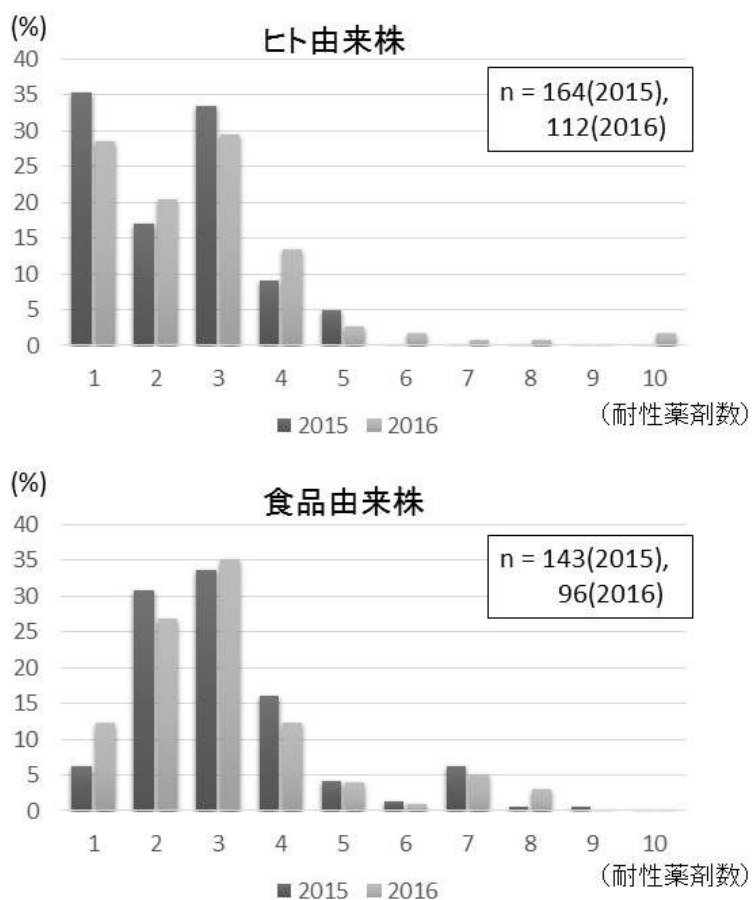


表5. 多剤耐性(6剤以上)を示したヒト由来サルモネラ株

菌株	血清型	耐性薬剤数	耐性抗菌剤
1	Minnesota	6	ABPC, KM, TC, CTX, CAZ, CFX
2	Brandenburg	6	ABPC, KM, SM, TC, ST, CP
3	Blockley	7	ABPC, KM, SM, TC, CP, CTX, CAZ
4	Typhimurium	8	ABPC, GM, SM, TC, ST, CP, CPFX, NFLX
5*	Thompson	10	ABPC, SM, TC, ST, CP, CTX, CAZ, CFX, CPFX, NFLX
6*	Thompson	10	ABPC, SM, TC, ST, CP, CTX, CAZ, CFX, CPFX, NFLX

*No.5とNo.6は異なる地研で分離された

図4. ヒト及び食品由来サルモネラ株の各種薬剤耐性率

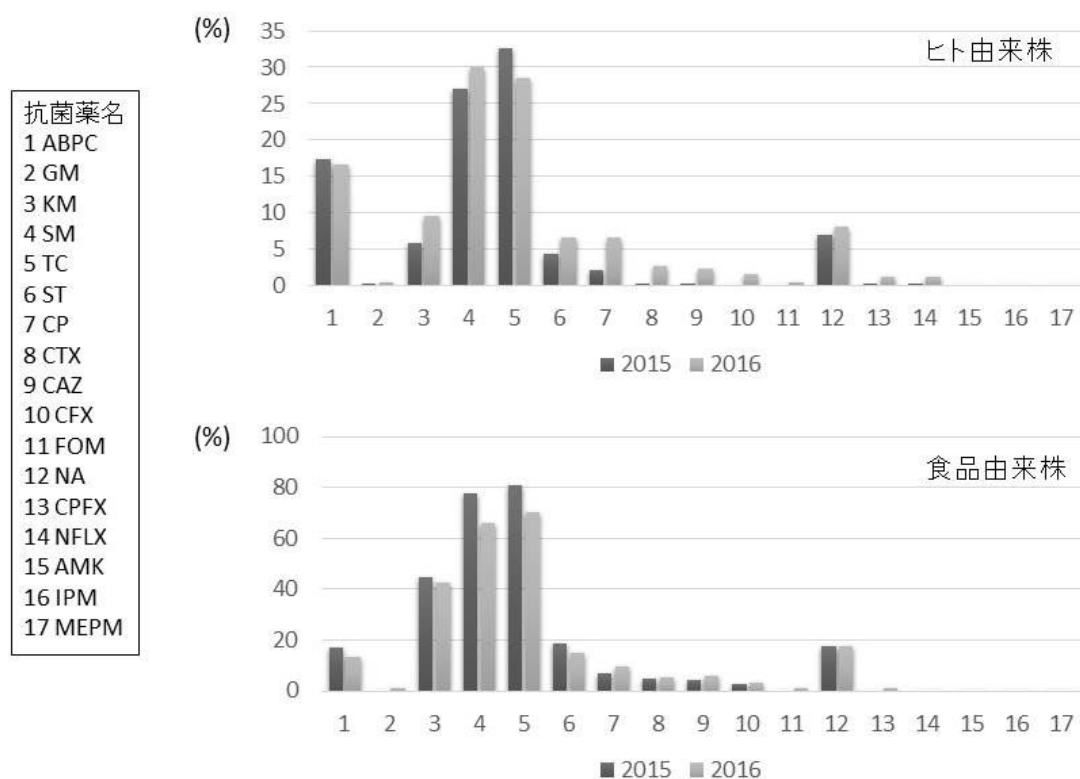


表6. 食品から分離された血清型と分離されなかった血清型別のヒト由来サルモネラ株の耐性率*

食品からの分離の有無と血清型	食品由来株		ヒト由来株	
	菌株数 (耐性株)	耐性率	菌株数 (耐性株)	耐性率
分離された型 (8/15): Infantis, Enteritidis, O4:i:-, Typhimurium, Schwarzengrund, Manhattan, Braenderup, Agona	233 (217)	93.1%	296 (168)	56.8%
分離されなかった型 (7/15): Thompson, Saintpaul, Chester, Newport, Nagoya, Litchfield, Bareilly	—	—	173 (33)	19.1%

*図2に示すヒト由来の分離株数が上位15血清型のうち、食品からも分離された型と分離されなかった型に分けて、それぞれのヒト由来株の耐性率を算出した。

表7. セフェム系薬(CTX, CAZ, CFX)に耐性を示したヒト及び食品由来サルモネラ株

由来	菌株	血清型	CTX	CAZ	CFX	耐性薬剤数
ヒト	1	Thompson	R	R	R	10
	2	Thompson	R	R	R	10
	3	Thompson	R	S	S	2
	4	Infantis	R	R	S	3
	5	Infantis	S	S	R	2
	6	Typhimurium	R	R	S	5
	7	Enteritidis	R	R	S	5
	8	Blockley	R	R	S	7
	9	Minnesota	R	R	R	6
食品	1	Infantis	R	R	R	9
	2	Infantis	R	R	R	8
	3	Infantis	R	R	R	8
	4	Infantis	R	R	R	8
	5	Infantis	R	I	R	7
	6	Infantis	I	R	R	7
	7	Manhattan	R	R	S	5
	8	Manhattan	R	R	S	5
	9	Manhattan	R	R	S	5
	10	Manhattan	R	R	S	5
	11	Blockley	R	R	S	6
	12	Blockley	R	R	S	7
	13	Blockley	R	R	S	7
	14	Heidelberg	R	R	R	6
	15	O4:UT	R	R	R	6

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 28 年度 分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 ヒトおよび食品由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究

研究分担者	小西 典子	（東京都健康安全研究センター微生物部）
研究協力者	尾畑 浩魅	（東京都健康安全研究センター微生物部）
	赤瀬 悟	（東京都健康安全研究センター微生物部）
	下島優香子	（東京都健康安全研究センター微生物部）
	西野由香里	（東京都健康安全研究センター微生物部）
	横山 敬子	（東京都健康安全研究センター微生物部）
	平井 昭彦	（東京都健康安全研究センター微生物部）
	甲斐 明美	（国立感染症研究所）

研究要旨

2016 年に分離されたヒト由来株 137 株のうち 1 薬剤以上に耐性を示した株は 33.6%で、食品由来株の 94.9%と比較して耐性率は低かった。フルオロキノロン系薬剤である CPMX および NFLX に耐性を示す株はヒト由来株で 2 株（1.5%）、食品由来株では認められなかった。第 3 世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株はヒト由来株で 4 株（2.9%）、食品由来株で 6 株（5.1%）であり、2015 年分離株（ヒト由来株 2 株、食品由来株 5 株）と比較して増加していた。CTX に耐性を示したヒト由来株 4 株中 1 株は、9 薬剤（ABPC、SM、TC、ST、CP、Su、CPMX、NFLX、CTX）に耐性を示した。フルオロキノロンおよび第 3 世代セファロスポリン系薬剤の両薬剤に耐性を示す株が蔓延すれば、治療に少なからず影響がでるものと考えられた。

2011 年～2015 年に分離した *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率を比較すると、*C. jejuni* および *C. coli* 共に 2015 年分離株は最も低い耐性率であった。また治療の第一選択薬である EM に対しては、いずれの菌種とも耐性率は低く EM 耐性菌の増加は認められなかった。

市販食肉を対象に、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子（*mcr-1*）陽性大腸菌の検出を試みた結果、鶏肉 55 検体中 8 検体（14.5%）、豚肉 49 検体中 1 検体（2.0%）が *mcr-1* を保有していた。今回の調査から、*mcr-1* 保有大腸菌が広く市販食用肉にも分布していることが明らかとなった。今後、薬剤耐性菌分離状況を注意深く観察していく必要がある。

A. 研究目的

医療現場では薬剤耐性菌の出現が依然として増加しており、問題となっている。このような状況下、2011 年 WHO は薬剤耐性菌に対し、ヒト、動物、環境といった垣根を越えた「One health」としての世界規模の取り組みの必要性を示した。わが国でも耐性菌をコントロールするための「薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン」が 2016 年 4 月に示され、抗菌薬の適正な使用と薬剤耐性菌の動向調査・監視の強化等を行うことになった。

耐性菌の蔓延を防止するためには、その基礎資料となる薬剤耐性菌の変化や拡大を継続的に監視していくことが重要である。

そこで今回、人および食品から分離されるサルモネラおよびカンピロバクターについて薬剤耐性菌出現状況を調べた。更に市販食肉から分離された大腸菌を対象にプラスミド性コリスチン耐性遺伝子（*mcr-1*）保有状況を調べた。

B. 研究方法

1. ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2016 年にヒト（下痢症患者および無症状病原体保有者）から分離された 137 株および食品から分離された 118 株を供試した。集団事例由来株は代表株 1 株を計上した。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験に用いる薬剤は、同じく研究分担者である埼玉県衛生研究所と共通の薬剤を用いた。すなわち ABPC, GM, KM, SM, TC, SXT, CP, CTX, Su, FOM, NA, CPF, NFLX, AMK, IPM, MEPM の 16 薬剤である。更に一部の株については、セフトラジジム (CAZ), セフォキシチン (CFX), コリスチン (CL) を追加した。これらの薬剤についてセンシディスク (BD) を用いた KB ディスク法で調べた。

2. ヒト由来カンピロバクターの耐性菌出現状況

2015 年に都内病院で分離された *C. jejuni* 116 株および *C. coli* 8 株を対象に薬剤感受性試験を行った。供試薬剤は TC, NA, CPF, NFLX, OFL, EM の 6 薬剤である。

3. 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出

1) 供試検体

2015 年に都内で流通した鶏肉 55 検体、豚肉 49 検体、牛肉 47 検体を用いた。

2) 大腸菌分離方法

食肉 25 g に普通ブイヨン 30ml を加えストマッキング後、乳剤を XM-G 寒天培地 (日水製薬) に滴下し、塗抹培養を行う方法と、食肉 25 g に緩衝ペプトン水 (BPW) 225ml を加え 35℃ で 18 時間培養後、XM-G 寒天培地に分離培養する方法で行った。塗抹した XM-G 寒天培地は、35℃、18~24 時間培養後、出現した大腸菌定型集落を薬剤感受性試験に供試した。

3) 供試菌株

鶏肉 55 検体由来 159 株、豚肉 49 検体由来 55 株および牛肉 47 検体 46 株の大腸菌を供試した。

4) 薬剤感受性試験

コリスチンに対する MIC を寒天平板希釈法 (0.25 µg/mL~16 µg/mL) で測定した。MIC が 4 µg/mL 以上の株についてプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) の保有を PCR 法で確認した (Liu YY, et al. Lancet. Infect. Dis. 2016)。

4. 倫理面への配慮

全てのヒト由来株および調査情報は、個人を特定できる情報を含まない状況で収集し、本研究に用いた。なお、本研究は東京都健康安全研究センター倫理審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1. ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

2016 年にヒトから分離されたサルモネラは 137 株で 37 血清型に、食品由来株は 118 株で 14 血清型に分類された (表 1)。分離された血清型を比較すると 04 群 Schwarzengrund, 04 群 Typhimurium, 04 群 Agona, 07 群 Infantis はヒトおよび食品由来共に多く分離されていた。

ヒト由来株 137 株のうち 1 薬剤以上に耐性を示した株は 33.6% で、食品由来株の 94.9% と比較して耐性率は低かった。血清群別では 04 群 68 株中 36 株 (52.9%), 07 群 31 株中 1 株 (3.2%), 08 群 13 株中 5 株 (38.5%), 09 群 14 株中 3 株 (21.4%), 03, 10 群 5 株中 1 株 (20.0%) であった。01, 3, 19 群および 017 群 (各 2 株), 013 群および 018 群 (各 1 株) に耐性菌は認められなかった (表 2)。

一方、供試した食品由来 118 株のほぼ全ての株は鶏肉および鶏肉内臓由来であった。供試した薬剤 16 薬剤中 1 薬剤以上に耐性を示した株は 118 株中 112 株 (94.9%) で耐性率は非常に高かった。血清群ごとに分離菌株数と耐性率をみると 04 群は 65 株中 61 株 (93.8%), 07 群は 35 株中 34 株 (97.1%), 08 群は 10 株中 9 株 (90.0%) であった (表 2)。

ヒトおよび食品由来株の薬剤別耐性率を図 1 に示した。ヒト由来株で耐性率が高かった薬剤は Su (32.8%), TC (32.1%), SM (30.7%) であった。食品由来株では TC (79.7%), SM (74.6%), Su (72.9%), KM (61.0%) であり、耐性率の高い薬剤は、ヒト由来株と食品由来株で同様の傾向であった。

フルオロキノロン系薬剤である CPF および NFLX に耐性を示す株はヒト由来株で 2 株 (1.5%), 食品由来株では認められなかった。ヒト由来フルオロキノロン系薬剤耐性株の血清型は 07 群 Thompson および 08 群 Kentucky であった。第 3 世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株はヒト由来株で 4 株 (2.9%), 食品由来株で 6 株 (5.1%) であり、2015 年分離株 (ヒト由来株 2 株, 食品由来株 5 株) より増加していた。ヒト由来 CTX 耐性株の血清型は 07 群 Infantis が 2 株, 07 群 Thompson, 08 群 Blockley が各 1 株, 食品由来株は 08 群 Blockley が 5 株および 07 群 Infantis が 1 株であった。

2. ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

散発患者由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン

耐性率は 37.1%で、2011 年以降では最も低い耐性率であった（図 2）。一方、*C. coli*では耐性率は 50%で、*C. jejuni*よりは耐性率が高いが、2011 年以降では最も低かった（図 3）。治療の第一選択薬である EM 耐性株はいずれの菌種でも低かった。

3. 市販流通する食肉からのコリスチン耐性大腸菌の検出

市販の食肉（鶏肉、豚肉、牛肉）から分離された大腸菌を対象にコリスチンに対する MIC を寒天平板希釈法で測定した。4 µg/ml 以上に耐性を示した株は、鶏肉由来では 159 株中 10 株（6.3%）、豚肉由来 55 株中 1 株（1.8%）、牛肉由来は認められなかった。これらの株を対象に *mcr-1* の保有を PCR 法で調べた結果、鶏肉由来株では 8 株、豚肉由来株では 1 株が陽性となった（表 3）。

市販食肉を対象とすると、鶏肉 55 検体中 8 検体（14.5%）、豚肉 49 検体中 1 検体（2.0%）がプラスミド性コリスチン耐性遺伝子を保有していた（表 4）。

D. 考察

ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの血清型を比較すると、04 群 Schwarzengrund, 04 群 Typhimurium, 04 群 Agona, 07 群 Infantis は共通して高率に検出されていることから、食品（鶏肉および鶏肉内臓肉）がヒトのサルモネラ症に影響を与えていることが示唆された。

一方、0 群別耐性率を比較すると、ヒト由来株より食品由来株で耐性率が高い傾向であった。薬剤別耐性率はヒトおよび食品由来株でほぼ同様の傾向であった。食品由来株で耐性率が高かった薬剤は TC, SM, Su, KM で、いずれも耐性率は 70%以上であった。

ヒト下痢症の治療薬として用いられるフルオロキノロン耐性株はヒト由来株 2 株のみであり、耐性率は低かった。しかし CTX に耐性を示したヒト由来株 4 株中 1 株は、9 薬剤（ABPC, SM, TC, ST, CP, Su, CPM, NFLX, CTX）に耐性を示した。この患者は散発患者であるが、感染源等是不明であった。このようなフルオロキノロンおよび第 3 世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す株が蔓延すれば、治療に少なからず影響がでるものと考えられた。

カンピロバクター食中毒は依然として多く発生しており、東京都では 2016 年に発生した食中毒 129 事例中 32 事例（24.8%）がカンピロバクターによるものである。今年度は散発患

者由来株を対象として薬剤耐性菌出現状況を調べた。2011 年～2015 年に分離した株についてフルオロキノロン耐性率を比較すると、*C. jejuni* および *C. coli* 共に 2015 年分離株は最も低い耐性率であった。これらの理由については不明であり、特に *C. coli* では供試数が少ないことから単純な比較は難しいと考えられるが、今後の動向を注意深く見る必要があると考えられた。一方、治療の第一選択薬である EM に対しては、いずれの菌種とも耐性率は低く EM 耐性菌の増加は認められていない。

市販食肉を対象として、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子保有大腸菌の分離を試みた結果、鶏肉 55 検体中 8 検体（14.5%）、豚肉 49 検体中 1 検体（2.0%）から検出された。*mcr-1* 陽性大腸菌が検出された鶏肉の産地は国産（6 検体）、ブラジル（2 検体）、豚肉はスペイン産であった。コリスチンは動物用医薬品や飼料添加物として長年、豚、鶏、および牛に使用されている。今回の調査で、*mcr-1* 保有大腸菌が市販鶏肉および豚肉から分離されたことから、広く食用肉にも分布していることが明らかとなった。

E. 結論

2016 年にヒトから分離されたサルモネラは 137 株、食品由来株は 118 株で、04 群 Schwarzengrund, 04 群 Typhimurium, 04 群 Agona, 07 群 Infantis が共通に分離されていた。

ヒト由来株 137 株のうち 1 薬剤以上に耐性を示した株は 33.6%で、食品由来株の 94.9%と比較して耐性率は低かった。フルオロキノロン系薬剤である CPM および NFLX に耐性を示す株はヒト由来株で 2 株（1.5%）、食品由来株では認められなかった。第 3 世代セファロスポリン系薬剤である CTX 耐性株はヒト由来株で 4 株（2.9%）、食品由来株で 6 株（5.1%）であり、2015 年分離株（ヒト由来株 2 株、食品由来株 5 株）より増加していた。

CTX に耐性を示したヒト由来株 4 株中 1 株は、9 薬剤（ABPC, SM, TC, ST, CP, Su, CPM, NFLX, CTX）に耐性を示した。このようなフルオロキノロンおよび第 3 世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示す株が蔓延すれば、治療に少なからず影響がでるものと考えられた。

2011 年～2015 年に分離した *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率を比較すると、*C. jejuni* および *C. coli* 共に 2015 年分離株は最も低い耐性率であった。また治療の第一選択薬である EM に対しては、いずれの菌

種とも耐性率は低く EM 耐性菌の増加は認められなかった。

市販食肉を対象に、*mcr-1* 陽性大腸菌の検出を試みた結果、鶏肉 55 検体中 8 検体 (14.5%)、豚肉 49 検体中 1 検体 (2.0%) がプラスミド性コリスチン耐性遺伝子を保有していた。今回の調査から、*mcr-1* 保有大腸菌が広く市販食用肉にも分布していることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 佐藤友美, 白井 優, 小西典子, 甲斐明美, 田村 豊: 牛及び食肉由来メチシリン耐性黄色

ブドウ球菌 (MRSA) の特徴とヒトへの影響, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年 6 月, 神奈川県.

- 2) 西野由香里, 下島優香子, 井田美樹, 福井理恵, 黒田寿美代, 上原さとみ, 平井昭彦, 貞升健志: 東京都で流通する食品からのコリスチン耐性大腸菌の検出, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 2016 年 9 月, 東京都.

- 3) 小西典子, 赤瀬 悟, 尾畑浩魅, 原田幸子, 森功次, 門間千枝, 平井昭彦, 甲斐明美, 貞升健志: ヒトおよび食品由来サルモネラの血清型の特徴と耐性菌出現状況, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 2016 年 9 月, 東京都.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. ヒトおよび食品由来サルモネラの上位血清型(2016年, 東京都)

ヒト由来株				食品由来株			
O群	血清型	分離数	(%)	O群	血清型	分離数	(%)
O7	Infantis	18	(13.1)	O4	Schwarzengrund	41	(34.7)
O4	Chester	13	(9.5)	O7	Infantis	34	(28.8)
O9	Enteritidis	13	(9.5)	O4	Agona	13	(11.0)
O4	Schwarzengrund	12	(8.8)	OUT	r: 1, 5	7	(5.9)
O4	Typhimurium	11	(8.0)	O8	Blockley	6	(5.1)
O4	i: -	7	(5.1)	O4	Typhimurium	4	(3.4)
O4	Agona	7	(5.1)	O8	Manhattan	4	(3.4)
O4	Stanley	6	(4.4)	O4	Heidelberg	2	(1.7)
O7	Thompson	6	(4.4)	O4	i: -	2	(1.7)
O4	Saintpaul	5	(3.6)	O4	Derby	1	(0.8)
O3,10	Anatum	4	(2.9)	O4	運動性(-)	1	(0.8)
O7	Bareilly	3	(2.2)	O4	Bredeney	1	(0.8)
O8	Newport	3	(2.2)	O7	Tennessee	1	(0.8)
O4	Brandenburg	2	(1.5)	O21	Minnesota	1	(0.8)

集団事例は1株を計上

ヒト由来株: 137株, 37血清型,

食品由来株: 118株, 14血清型

表2. 東京都で分離されたサルモネラの薬剤耐性率(2016年)

O群	ヒト由来株			食品由来株		
	供試数	耐性数	(%)	供試数	耐性数	(%)
O4	68	36	(52.9)	65	61	(93.8)
O7	31	1	(3.2)	35	34	(97.1)
O8	13	5	(38.5)	10	9	(90.0)
O9	14	3	(21.4)			
O3,10	5	1	(20.0)			
O1,3,19	2	0				
O13	1	0				
O17	2	0				
O18	1	0				
O21				1	1	(100)
OUT:r:1, 5				7	7	(100)
合計	137	46	(33.6)	118	112	(94.9)

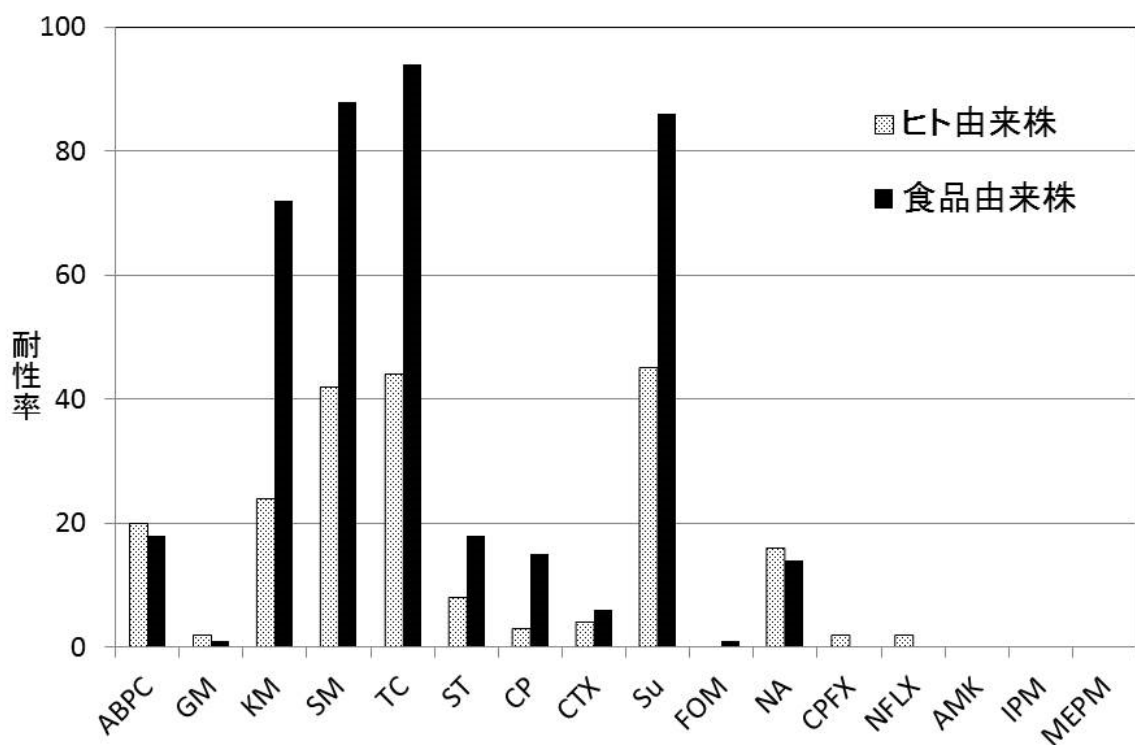


図1. ヒトおよび食品由来サルモネラの薬剤別耐性率(2016年, 東京都)

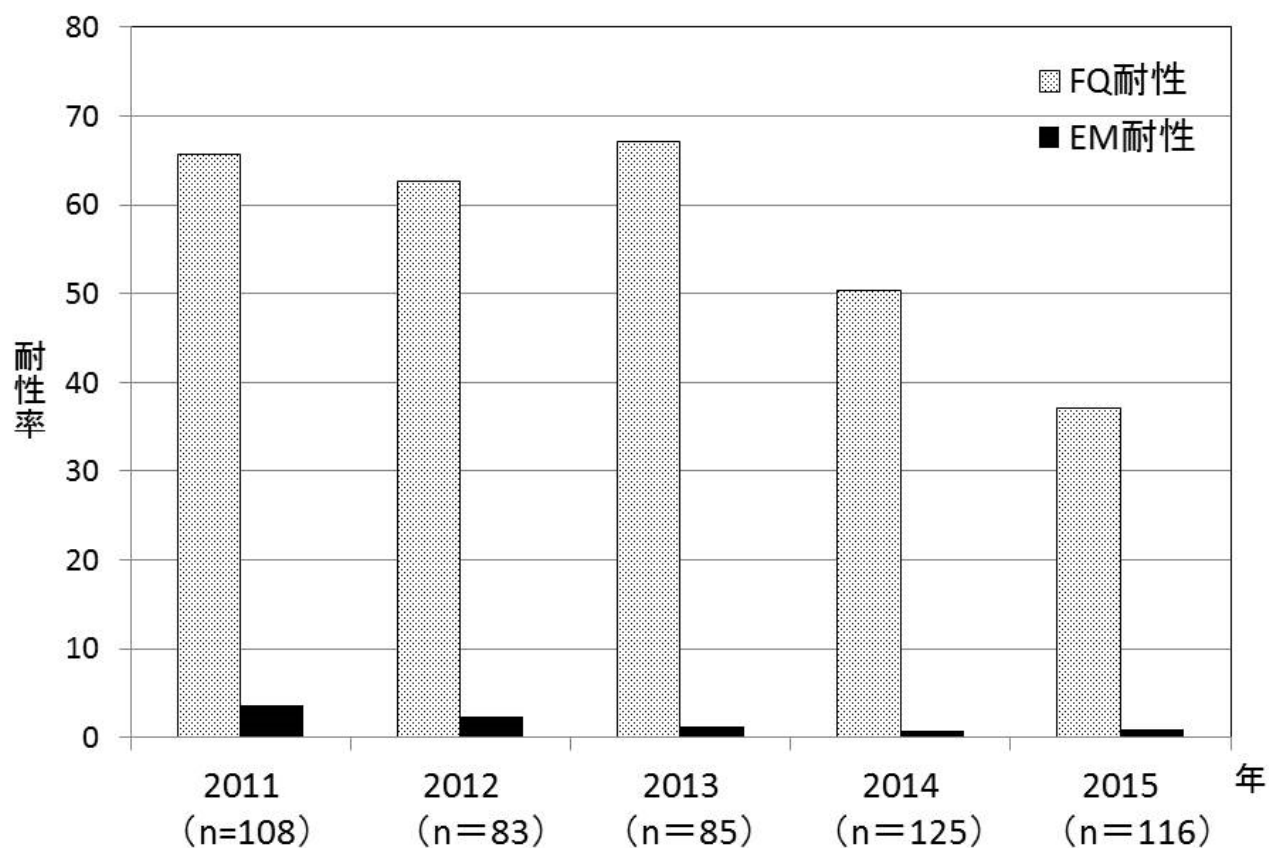


図2. 散発下痢症由来*C. jejuni*のフルオロキノロンおよびエリスロマイシンに対する耐性株出現状況

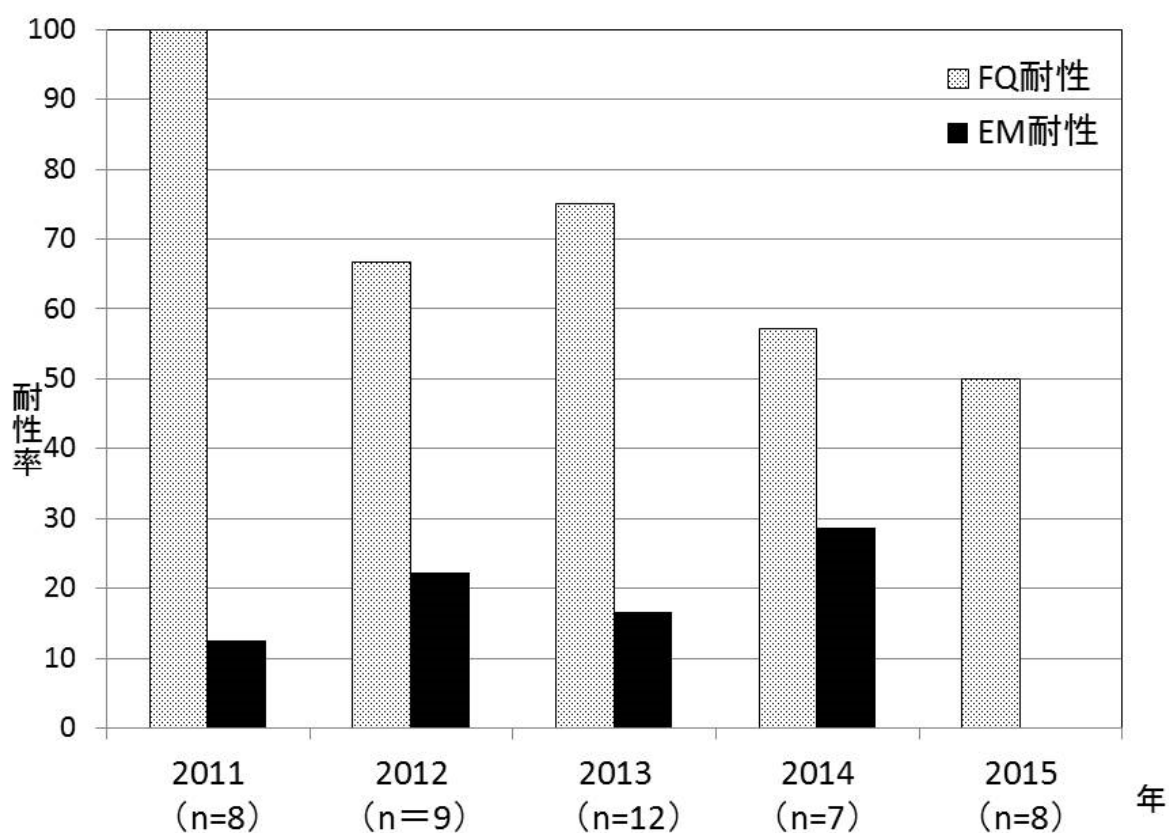


図3. 散発下痢症由来 *C. coli* のフルオロキノロンおよびエリスロマイシンに対する耐性株出現状況

表3. 食肉由来コリスチン耐性大腸菌の出現状況

由来	検体数	供試菌株数	コリスチン耐性株 (4μg/ml以上)	<i>mcr-1</i> 陽性数
鶏肉	55	159	10	8
豚肉	49	55	1	1
牛肉	47	46	0	0

*mcr-1*陽性大腸菌のコリスチンに対するMICは全株 8μg/ml以上であった。

表4. 市販食肉からのプラスミド性コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*)
保有大腸菌検出数

検体	供試数	陽性数(%)	陽性検体の原産国
鶏肉	55	8 (14.5)	日本(6), ブラジル(2)
豚肉	49	1 (2.0)	スペイン(1)
牛肉	47	0	

厚生労働科学研究費補助（食品の安全確保推進研究事業）
平成 28 年度 分担研究報告書
食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題：ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学

研究分担者	倉園貴至	埼玉県衛生研究所
研究協力者	青木敦子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	砂押克彦	埼玉県衛生研究所
研究協力者	松下明子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	近真理奈	埼玉県衛生研究所
研究協力者	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	門脇奈津子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	上野裕之	さいたま市健康科学研究センター
研究協力者	土井りえ	埼玉県食肉衛生検査センター

研究要旨

ヒトの健康に被害を与える可能性がある薬剤耐性菌の動向を把握するため、ヒトや食品等の環境から分離される食中毒菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行うとともに、ヒトおよび食品を対象に ESBL 産生菌の検索を行った。

埼玉県内で 2016 年に分離され、供試したヒト（散発下痢症例及び健康保菌者）由来サルモネラは 187 株で 44 血清型に型別された。薬剤耐性では 73 株（39.0%）が供試した 16 薬剤のいずれかに対して耐性を示した。CTX 耐性は 5 株、フルオロキノロン耐性は 1 株分離された。動物由来株は、イヌ 96 頭、ネコ 55 頭および野生アライグマ 181 頭の検査を行い、アライグマ 2 頭からサルモネラが分離されたが、感受性株であった。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 131 株が分離され、薬剤感受性試験では、131 株中 24 株（18.3%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。CTX 耐性 4 株が分離された。健康者糞便の ESBL 産生菌検索では 152 検体中 6 検体から分離された。

食品の汚染実態調査では、県内の市場で購入した食肉等 164 検体を供試し、サルモネラは鶏肉等 45 検体中 16 検体から 19 株、ESBL 産生菌は鶏肉 21 検体中 7 検体から 13 株、豚内臓肉 24 検体中 8 検体から 14 株が分離された。

食鳥肉のフキトリ調査では、出荷前最終洗浄後のと体等の拭き取り検査を実施し、カンピロバクターが 30 検体中 4 検体から、サルモネラは 3 検体から分離された。

A. 研究目的

近年、ヒトの健康に危害を与える可能性のある耐性菌をコントロールするために、国際的な耐性菌対策への行動計画が求められるようになっている。そこで、耐性菌情報の提供を目的として、治療薬剤であるフルオロキノロン剤や第三世代セファロスポリン等に対して抵抗を示す耐性菌のヒトや環境からの分離状況を調査し、分離菌の血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行った。また、ヒトおよび食品を対象に ESBL 産生菌の検索を行った。

B. 研究方法

I. 供試菌株

1. ヒト由来

埼玉県内で分離された散発下痢症例及び健康保菌者由来のサルモネラ・腸管出血性大腸菌を医療機関等の協力を得て広く収集した。また、埼玉県衛生研究所に搬入された健康ヒト糞便から大腸菌を分離し、その薬剤感受性を検討した。

2. 食品由来

買い取りによる検体収集を行い、サルモネラ・腸管出血性大腸菌の汚染調査に供した。また、食肉等からの ESBL 産生菌の検索も行った。

3) 食鳥処理場由来

食鳥処理場でのと体フキトリからのサルモネラ・カンピロバクターの分離を検討し、調査に供した。

4) 動物由来

埼玉県動物指導センターの協力で得られたイヌ・ネコの糞便に加え、

「埼玉県アライグマ防除実施計画」

に基づき捕獲された野性化アライグマの糞便からのサルモネラ分離を検討し、調査に供した。

II. 薬剤感受性試験

収集した菌株は米国臨床検査標準化協会 (CLSI) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク (センシディスク:BBL) を用いて行った。サルモネラ、腸管出血性大腸菌はクロラムフェニコール (CP;30 µg)、ストレプトマイシン (SM;10 µg)、テトラサイクリン (TC;30 µg)、カナマイシン (KM;30 µg)、アミノベンジルペニシリン (ABPC;10 µg)、ナリジクス酸 (NA;30 µg)、セフォタキシム (CTX;30 µg)、シプロフロキサシン (CPFX;5 µg)、ゲンタマイシン (GM;10 µg)、ホスホマイシン (FOM;50 µg)、ノルフロキサシン (NFLX;5 µg)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST;25 µg)、イミペネム (IMP;10 µg)、アミカシン (AMK;30 µg)、メロペネム (MEPM;10 µg)、セフォキシチン (CFX;30 µg)、セフトジジム (CAZ;30 µg)、コリスチン (CL;10 µg) の 18 薬剤を供試した。また、コリスチンの感受性については耐性遺伝子である *mcr-1* の検出を PCR 法で検討した。カンピロバクターはテトラサイクリン (TC;30 µg)、ナリジクス酸 (NA;30 µg)、シプロフロキサシン (CPFX;5 µg)、ノルフロキサシン (NFLX;5 µg)、オフロキサシン (OFLX;5 µg)、エリスロマイシン (EM;15 µg) の 6 薬剤を供試した。

C. 研究結果

(1) ヒト由来サルモネラ

埼玉県内で 2016 年に、散発下痢症患者および食品従事者の検便などにおいて健康者から分離されたサルモネラの血清型別分離状況を表 1 に示した。分離された 187 株は 44 血清型に型別され、*S. Infantis* が 20 株と最も多く分離され、次いで 04:i:- が 18 株であった。

分離株について薬剤感受性試験を実施した結果、供試した 187 株のうち 73 株 (39.0%) が 18 薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された *S. Infantis* は 20 株中 8 株 (40.0%) が耐性を示したが、04:i:- は供試 18 株中 16 株 (88.9%) が耐性株であった。薬剤別の耐性状況を表 2 に示した。耐性 73 株中 51 株が TC 耐性で、次いで SM 耐性が 49 株、ABPC 耐性が 31 株であった。

分離株の区分別耐性パターンを表 3 に示す。SM・TC・ABPC 耐性が 14 株と最も多く、次いで SM・TC 耐性が 12 株であった。また、2 剤以上の複数薬剤に耐性を示す株は 55 株分離され、そのうち第 3 世代セフェム系薬剤である CTX に対する耐性菌が 5 株、フルオロキノロン剤耐性株が 1 株分離された (表 3)。CTX 耐性菌は耐性遺伝子 CTX-M-15 を保有する *S. Blockley* が 2 株、CTX-M-2 を保有する *S. Muenchen*、SHV-12 と TEM-1D を保有する 04:i:-、CMY-2 like を保有する *S. Minnesota* がそれぞれ 1 株ずつであった。フルオロキノロン耐性株は、血清型 *S. Kentucky* であった (表 4)。

(2) 動物由来サルモネラ

イヌ、ネコおよび野生化アライグマの

サルモネラ保菌状況調査の結果を表 5 に示す。イヌ 96 頭、ネコ 55 頭のいずれからサルモネラは分離されなかった。野生化アライグマは 181 頭中 2 頭 (1.1%) から分離され、血清型は *S. Nagoya* であった。薬剤感受性は、供試した 18 薬剤に対して感受性を示した。

(3) 腸管出血性大腸菌

埼玉県内で 2016 年に、ヒトから分離された腸管出血性大腸菌の血清型別分離状況を表 6 に示した。分離された 131 株で最も多く分離された血清型は、0157:H7 が 87 株、次いで 026:H11 が 23 株であった。分離 131 株の薬剤感受性試験の結果、供試した 18 薬剤のいずれかに耐性であったのは 24 株 (18.3%) であった (表 7)。耐性パターンは 11 パターンに分かれ、最も多かったのは SM 耐性で 5 株が該当した。また、CTX 耐性株が 4 株分離された。

(4) ヒト由来 ESBL 産生菌

ESBL 産生菌の検索では 152 検体中 4 検体から 4 株が分離された (表 8)。菌種は全て *E. coli* で、CTX-M-9group 保有株が 2 株、TEM と CTX-M-9group の両方を保有する株が 2 株であった。CTX-M-9group 保有 2 株と、TEM と CTX-M-9group 保有 1 株がディスク法による感受性試験で、CTX のみならずフルオロキノロン剤に耐性を示した。

(5) 食品からの分離

2016 年 6 月から 2017 年 1 月にかけて、埼玉県内の市場等で食肉等 164 検体を購入し、サルモネラ、腸管出血性大腸菌の検査を行った。その結果、サルモネラは内臓肉 26 検体中 6 検体、鶏肉 21 検体中 9 検体から分離された。腸管出血性大

腸菌はいずれの検体からも分離されなかった（表 9）。内臓肉は豚タン及び豚カシラより分離された。その血清型は豚タンはすべて 04:i:-であり、豚カシラは *S. Agona* と 04:i:-であった。薬剤感受性では、04:i:-の 1 株を除き供試した 18 薬剤にいずれかに耐性を示した。鶏肉で分離されたのは *S. Infantis* が 8 株、*S. Schwarzengrund* が 4 株であった。*S. Infantis* の 1 株を除き供試した 18 薬剤にいずれかに耐性を示した（表 10）。

食品の ESBL 産生菌の検索では、購入した 164 検体から鶏肉等など 142 検体を供試した。ESBL は鶏肉 21 検体中 7 検体、豚タン 14 検体中 5 検体、豚カシラ 10 検体中 3 検体から分離された（表 11）。保有耐性遺伝子は、CTX-M-9group、CTX-M-1group および TEM 保有株いずれの材料からも分離されたが、SHV 保有株は鶏肉のみから分離された。

（6）食鳥処理場由来

食鳥処理場での出荷前最終洗浄後のと体等の拭き取り検査で、カンピロバクターが 30 検体中 4 検体から 8 株、サルモネラは 3 検体から 6 株分離された。薬剤感受性ではカンピロバクターでは供試 16 薬剤のいずれにも感受性であった。サルモネラは分離された 6 株すべてが供試した 18 薬剤にいずれかに耐性を示した（表 12）。

D. 考察

近年、ヒトの健康に危害を与える可能性がある薬剤耐性菌の問題に対応するために、国際的サーベイランス体制の確立が求められており、国内のヒトおよび食品など環境から分離される耐性菌の発生

状況を多角的に把握する必要がある。埼玉県では 2003 年に CTX 耐性腸管出血性大腸菌 026:H11 が分離され、フルオロキノロン耐性も *S. Typhimurium* (DT193) や *S. Schwarzengrund* が分離された、それ以降、毎年 CTX 耐性菌やフルオロキノロン耐性菌が分離されている。CTX 耐性菌では、保有する耐性遺伝子も多岐にわたり、CTX-M 型のみならず AmpC 型や CMY-型も分離されている。さらに、ヨーロッパやアメリカでその拡がりが見られる MLST 型 ST198 のフルオロキノロン耐性 *S. Kentucky* が 2014 年に初めて県内で確認されている。また、コリスチン耐性遺伝子である *mcr-1* の検出を検討し、幸いなことに今回は分離されなかったが、2015 年に都内で流通した食肉から *mcr-1* 保有の大腸菌が分離されていることから、今後も監視を続け、更なる情報収集の強化を図る必要がある。

E. 結論

CTX やフルオロキノロン耐性株の分離が続いており、その遺伝子型も多岐に亘ることから、今後とも耐性菌の動向調査を継続していくことが重要である。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 ヒトから分離されたサルモネラの血清型（2016）

O血清型	血清型名	国内		海外	計
		有症者	無症者		
O4	<i>S. Stanley</i>	7(1)	1		8(1)
	<i>S. Schwarzengrund</i>	6(5)	4(2)		10(7)
	<i>S. Saintpaul</i>	4(3)	4		8(3)
	<i>S. Chester</i>	8(1)	7		15(1)
	<i>S. Derby</i>		1(1)		1(1)
	<i>S. Agona</i>	3(2)	1(1)		4(3)
	<i>S. Typhimurium</i>	5(4)	1		6(4)
	<i>S. Brandenburg</i>		1		1
	O4:i:-	11(10)	7(6)		18(16)
	O4:b:-	4	2		6
	O4:-:-	1	1(1)		2(1)
O7	<i>S. Montevideo</i>		1		1
	<i>S. Thompson</i>	4	7		11
	<i>S. Infantis</i>	10(5)	10(3)		20(8)
	<i>S. Bareilly</i>		2		2
	<i>S. Mbandaka</i>		1		1
	<i>S. Tennessee</i>	1	9		10
	O7:eh:-	1(1)			1(1)
	O7:dlw:-	1			1
	O7:-:-		3		3
O8	<i>S. Narashino</i>	1			1
	<i>S. Nagoya</i>	3(1)	2		5(1)
	<i>S. Muenchen</i>		3(1)		3(1)
	<i>S. Manhattan</i>	1(1)	8(5)		9(6)
	<i>S. Newport</i>	2	1		3
	<i>S. Kentucky</i>		1(1)		1(1)
	<i>S. Blockley</i>	3(3)			3(3)
	<i>S. Litchfield</i>		2		2
	<i>S. Corvallis</i>	2(1)			2(1)
	<i>S. Hadar</i>		1(1)		1(1)
O9	<i>S. Typhi</i>			2(1)	2(1)
	<i>S. Berta</i>	1			1
	<i>S. Enteritidis</i>	10(7)	2		12(7)
O3,10	<i>S. Anatum</i>		1(1)		1(1)
	<i>S. Uganda</i>		1		1
	<i>S. Weltevreden</i>	1			1
	O3,10:dlw:-	2(2)			2(2)
O1,3,19	<i>S. Senftenberg</i>		2		2
O11	<i>S. Aberdeen</i>	1			1
O13	<i>S. Putten</i>	1			1
O16	O16:dlw:-	1			1
O18	<i>S. Cerro</i>	1			1
O21	<i>S. Minnesota</i>		1(1)		1(1)
OUT	OUT:r:-		1(1)		1(1)
計		96(47)	89(25)	2(1)	187(73)

()：薬剤耐性株数

表 2 ヒト由来サルモネラの薬剤別耐性株数（2016）

O群	血清型	供試菌株数	耐性菌株数	各薬剤別耐性菌株数（再掲）												
				ABPC	GM	KM	SM	TC	ST	CP	CTX	CFX	NA	CPFX	NFLX	CAZ
4	Stanley	8	1	1		1	1	1	1	1						
4	Schwarzengrund	10	7	1		5	4	4					2			
4	Saintpaul	8	3	1				1					1			
4	Chester	15	1	1			1	1								
4	Derby	1	1	1			1	1		1						
4	Agona	4	3				3	3								
4	Typhimurium	6	4	3	1		1	1								
4	O4:i:-	18	16	15	1	2	15	14	2	2	1		1			1
4	O4:-:-	2	1			1										
7	Infantis	20	8			4	7	8	1							
7	O7:eh:-	1	1					1								
8	Nagoya	5	1						1							
8	Muenchen	3	1	1	1	1	1	1			1					1
8	Manhattan	9	6	1			6	6								
8	Kentucky	1	1									1	1	1	1	
8	Blockley	3	3	2		3	3	3		3	2					2
8	Corvallis	2	1										1			
8	Hadar	1	1				1	1					1			
9	Typhi	2	1										1			
9	Enteritidis	12	7	3			3						2			
3,10	Anatum	1	1					1								
3,10	O3,10:l,w:-	2	2					2	2							
21	Minnesota	1	1	1			1	1			1	1				1
UT	OUT:r:-	1	1				1	1								
計		187	73	31	3	17	49	51	7	7	5	2	10	1	1	5

表 3 ヒトから分離されたサルモネラの薬剤耐性パターン (2016)

	国内		海外	計
	有症者	無症者		
供試菌株数	96	89	2	187
耐性株数	47	25	1	73
(%)	49.0%	28.1%	50.0%	39.0%
薬剤耐性パターン				
SM	3			3
TC	2	2		4
KM	2	1		3
ABPC	2			2
NA	4		1	5
SXT	1			1
SM・TC	5	7		12
TC・SXT	2			2
KM・ABPC	4			4
KM・NA		1		1
ABPC・NA	1			1
SM・TC・KM	4	2		6
SM・TC・ABPC	8	6		14
SM・TC・NA		1		1
SM・TC・GM	1			1
CP・SM・TC・KM	1			1
CP・SM・TC・ABPC		1		1
CP・SM・ABPC・SXT	1			1
SM・TC・ABPC・NA	1			1
SM・TC・KM・SXT	1			1
SM・TC・ABPC・GM		1		1
NA・CPFX・NFLX・LVFX		1		1
SM・TC・ABPC・CTX・CFX・CAZ		1		1
CP・SM・TC・KM・ABPC・CTX・CAZ	2			2
CP・SM・TC・KM・ABPC・SXT	1			1
SM・TC・KM・ABPC・CTX・GM・CAZ		1		1
CP・SM・TC・KM・ABPC・CTX・SXT・CAZ	1			1

CP:クロラムフェニコール, SM:ストレプトマイシン, TC:テトラサイクリン, KM:カナマイシン
 ABPC:アンピシリン, NA:ナリジクス酸, CTX:セフトキシム, CPFX:シプロフロキサシン
 GM:ゲンタマイシン, NFLX:ノルフロキサシン, CAZ:セフトジウム

表 4 フルオロキノロン耐性およびセフェム耐性 *Salmonella* 分離例 (2016)

No.	OH血清型	血清型名	区分	耐性パターン	備考
1	O8:H ₂ Z ₆	Kentucky	無症者	NA・CPFX・NFLX	GyrA S83F+D87N, ParC S80I
2	O8:d:1,2	Muenchen	無症者	SM・TC・KM・ABPC・CTX・GM・CAZ	<i>bla</i> CTX-M-2
3	O8:k:1,5	Blockley	有症者	CS・SM・TC・KM・ABPC・CTX・CAZ	<i>bla</i> CTX-M-15
4	O4:H ₁ -		有症者	CS・SM・TC・KM・ABPC・CTX・SXT・CAZ	<i>bla</i> SHV-12, TEM-1D
5	O21:b ₁ en ₁ x	Minnesota	無症者	SM・TC・ABPC・CTX・CFX・CAZ	<i>bla</i> CMY-2 like
6	O8:k:1,5	Blockley	有症者	CS・SM・TC・KM・ABPC・CTX・CAZ	<i>bla</i> CTX-M-15

表 5 イヌ、ネコおよびアライグマからのサルモネラ分離状況（2016）

由来動物	検査数	検出数（陽性率）	血清型名	薬剤耐性
イヌ	96	0（0%）		
ネコ	55	0（0%）		
アライグマ	181	2（1.1%）	S.Nagoya	感受性

表 6 腸管出血性大腸菌の血清型と毒素型（2016）

血清型	毒素型			計
	VT1	VT2	VT1&2	
O157:H7		36	51	87
O157:H-		2	8	10
O26:H11	23			23
O111:H-	2		1	3
O8:H9		1*		1
O76:H19	1			1
O121:H19		1	1	2
O128:H2			1	1
OUT:H45		1		1
OUT:H-	2			2
	28	41	62	131

*:VT2e

表 7 埼玉県内でヒトから分離された腸管出血性大腸菌の薬剤耐性パターン（2016）

	O157:H7	O157:H-	O26:H11	O111:H-	O8:H9	OUT:H45	OUT:H-	その他 [*]	計
供試菌株数	87	10	23	3	1	1	2	4	131
耐性株数	8	4	7	1	1	1	2	0	24
(%)	9.2%	40.0%	30.4%	33.3%	100.0%	100.0%	100.0%	0.0%	18.3%
薬剤耐性パターン									
SM		4	1						5
ABPC	3								3
NA			1						1
SM・TC	4								4
SM・SXT							1		1
ABPC・CTX・CAZ			1						1
SM・TC・ABPC	1			1					2
SM・TC・ABPC・FOM			1						1
CP・SM・TC・KM・SXT						1			1
SM・TC・ABPC・NA・SXT							1		1
CP・SM・TC・KM・ABPC・SXT					1				1

* O76:H19(1),O121:H19(2),O128:H2(1)

CP：クロラムフェニコール，SM：ストレプトマイシン，TC：テトラサイクリン，KM：カナマイシン

ABPC：アンピシリン，NA：ナリジクス酸，CTX：セフトキシム，FOM：ホスホマイシン，CAZ：セフトジウム

表 8 ヒトからのESBL分離状況（2016）

検査数	検出数	菌種	保有耐性遺伝子（株数）
152	4	<i>E. coli</i>	CTX-M-1group(2) TEM,CTX-M-9group(2)

表 9 食品からの食中毒菌分離状況（2016）

検体の種類	検体数	STEC	サルモネラ
食肉*	86	0	0
内臓肉**	26	0	7
鶏肉	21	0	9
魚介類	31	0	0
計	164	0	16

*:牛肉・牛挽肉・馬刺し・豚肉

**:豚内臓・豚タン・豚カシラ

表 10 食品からのサルモネラ分離状況（2016）

検体	検査数	陽性数(株数)	血清型（耐性薬剤）
豚タン	14	4（5）	O4:i:- (TC) O4:i:- (ABPC) O4:i:- (ABPC,CPFX) O4:i:- ((SM,TC,ABPC)2) O4:i:- ((-))
豚カシラ	10	2（2）	<i>S. Agona</i> (SM,TC) O4:i:- (SM,TC,ABPC)
鶏肉	21	10（12）	<i>S. Schwarzengrund</i> (TC) <i>S. Schwarzengrund</i> (TC,KM) <i>S. Schwarzengrund</i> (SM,TC,KM,SXT)(2) <i>S. infantis</i> (SM,TC)(3) <i>S. infantis</i> (TC,KM) <i>S. infantis</i> (SM,TC,SXT) <i>S. infantis</i> (SM,TC,KM,SXT) <i>S. infantis</i> (TC,ABPC,NA,CPFX,NFLX,FOM,SXT) <i>S. infantis</i> (-)

表 11 食品からのESBL産生大腸菌分離状況（2016）

検体	検査数	陽性数	保有耐性遺伝子（株数）
豚タン	14	5	TEM(3) CTX-M-1group(1) CTX-M-9group(3) TEM,CTX-M-9group(3)
豚カシラ	10	3	CTX-M-1group(1) CTX-M-9group(2) TEM,CTX-M-1group(1)
鶏肉	21	7	SHV(4) CTX-M-1group(4) CTX-M-9group(1) TEM,CTX-M-1group(2) TEM,CTX-M-9group(2)

表12 食鳥肉フキトリ検体からのサルモネラ・カンピロバクター分離状況（2016）

区分	検体数	陽性検体数	陽性株数	薬剤感受性パターン（株数）
サルモネラ	30	3	6	TC・KM(1) SM・TC・KM(3) SM・TC・KM・NA(2)
カンピロバクター	30	4	8	感受性(8)

分離されたサルモネラは *S.infantis*
 分離されたカンピロバクターはすべて *C.jejuni*

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 国内の市販鶏肉における ESBL 産生大腸菌およびバンコマイシン耐性腸球菌 VRE の分布状況とその諸性状に関する研究

研究分担者	五十君 静信	東京農業大学 生物応用化学科
研究協力者	石井 良和	東邦大学医学部 微生物・感染症学講座
	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	山本 詩織	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌およびバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は鶏肉を介してヒトへ伝播する可能性が想定されている。昨年度の研究では、国内の市販鶏肉が ESBL 産生大腸菌および VRE のいずれにも汚染されている実態を明らかにし、ESBL 産生大腸菌はヒトへの当該菌の伝播には鶏肉が最も重要である可能性が示唆された。一方、VRE は鶏肉から高頻度で検出されたものの、臨床上で重要視される VRE による汚染は少ないと考えられた。

本邦では、昨年度に引き続き、供試検体数を増やして ESBL 産生大腸菌および VRE の汚染実態調査を行い、さらに ESBL 産生大腸菌株が保有する IncI1 プラスミドの分子疫学的傾向について検討を行った。その結果、昨年度と同様、ESBL 産生大腸菌が高率で検出され、その多くがヒト由来 ESBL 産生大腸菌で多く認められる遺伝子を保有していた。また、IncI1 プラスミドの多くが CC-3 に分類され、これらが接合伝達性を示したことから、ヒトへの伝播に CC-3 型 IncI1 が関与している可能性が示唆された。一方、VRE では、分離株のほとんどがヒト臨床分離株の遺伝特性との差異が認められたことから、ヒト健康危害の影響は少ないと想定されたが、ヒトへの危害となり得る VRE が鶏肉から検出された事例が少なからずとも存在するため、今後も市販鶏肉における VRE の危害分析を継続する必要があると考えられる。

A. 研究目的

基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌は市中において拡散しており、食品を介した人への伝播に関する危害分析を通じて、鶏肉がヒトへの伝播に最も重要な食品であることが判明した。昨年度までの研究より、国内の市販鶏肉が ESBL 産生大腸菌に汚染されていると共に、ヒトへの当該菌の伝播には鶏肉が最も重要である可能性が示唆された。ESBL 産生菌は、菌株自体の直接伝播ではなく、ESBL 産生遺伝子を含むプラスミドがヒト腸内細菌へ伝播することで

ESBL 産生菌の拡散に大きく寄与する可能性が示唆されていることから、接合伝達性プラスミドによる鶏肉からヒトへの伝播リスクも推測された。

市販鶏肉からバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) が検出された事例より、鶏肉を介した当該菌の直接的なヒトへの伝播・拡散、さらにヒト腸管内に定着する可能性が危惧されている。昨年度までの研究により、鶏肉から高頻度で VRE が検出されたものの、臨床上で重要視される VRE による汚染は少ないと考えられた。

本邦では、昨年度に引き続き、供試検体数を増やしてESBL産生大腸菌およびVREの汚染実態調査を行い、さらにESBL産生大腸菌株が保有するIncI1プラスミドの分子疫学的傾向について検討を行った。

B. 研究方法

国内の市販国産及び輸入鶏肉 37 検体を追加してESBL産生大腸菌又はVREを分離した。ESBL産生大腸菌の分離には1µg/mLセフトキシム含有マッコンキー寒天培地及びクロモアガー-ESBL（関東化学）を用い、VREでは1µg/mLバンコマイシン含有Enterococcosel寒天培地（BD）及びクロモアガー・VREスクリーン（関東化学）を用いた。分離されたESBL産生大腸菌及びVRE菌株は、耐性遺伝子型別、薬剤感受性試験及びPFGE法による遺伝子型別に供した。ESBL産生大腸菌株については、プラスミドレプリコン型の同定及びIncI1のpMLST型別を行い、Plasmid MLST databases (<https://pubmlst.org/plasmid/>)におけるヒトおよび鶏由来株との比較を行った。

C. 研究結果

ESBL産生大腸菌の陽性率は、昨年度の結果と合わせて77.0%（87検体中67検体が陽性）であり、輸入鶏肉よりも国産鶏肉の陽性率の方がやや高い傾向を示した（表1、有意差なし [$P>0.05$]）。ESBL産生大腸菌は計80株分離され、国産鶏肉と輸入鶏肉間における耐性遺伝子の傾向では有意な差は認められなかった ($P>0.05$)。国産鶏肉由来株では $bla_{CTX-M-1}$ 及び $bla_{CTX-M-15}$ の両遺伝子を保有する割合が28.8%であり、輸入鶏肉由来株に比べ、高い傾向であった（図1）。一方、輸入鶏肉由来株では、 $bla_{CTX-M-2}$ 遺伝子を保有する割合が47.6%と高い傾向であった。βラクタム系以外の薬剤感受性を調べたところ、テトラサイクリン耐性が67.5%と最も多く、続いてストレプトマイシン耐性（60.0%）およびカナマイシン耐性（60.0%）であった。フルオロキノロン系薬剤であるシプロフロキサシンは、22.5%と比較的高い割合で耐性が認められた。分離菌株のPFGE

型別では、全体的に類似性は乏しく、各分離菌株は異なるものであることが示された。プラスミドレプリコン型は、IncFが68.48%、IncFIBが61.3%、IncI1が27.5%認められ（表2）、 $bla_{CTX-M-1}$ 及び $bla_{CTX-M-15}$ を併せ持つ分離菌株の63.2%がIncI1を保有していた。pMLST型別により、IncI1の36.4%がCC-3に分類され、そのほとんどが $bla_{CTX-M-1}$ 及び $bla_{CTX-M-15}$ をコードしていた（図2）。CC-3型IncI1を対象として接合伝達試験を行ったところ、約9割が接合伝達性を示した。

VREの陽性率は、昨年度の結果と合わせて72.2%（54検体中39検体が陽性）であり、輸入鶏肉よりも国産鶏肉の陽性率の方がやや高い傾向を示した（表1、有意差なし [$P>0.05$]）。しかし、分離菌株は全て $vanC1$ 又は $vanC2,3$ 遺伝子を保有する*E. gallinarum*であり、 $vanA$ 又は $vanB$ 遺伝子を保有する*E. faecium*及び*E. faecalis*は同定されなかった。分離菌株のバンコマイシンに対するMICは2~8 µg/mLと低い傾向であるものの、シプロフロキサシン耐性株が14.6%も認められ、MICは8 µg/mL以上であった。

D. 考察

国内の市販鶏肉におけるESBL産生大腸菌は、昨年度と同様、高率で分離された。また、ヒト由来ESBL産生大腸菌で比較的多く認められるCTX-M-1型とCTX-M-2型、近年の流行型として危惧されているCTX-M-15型が多く認められた。CTX-M-1及びCTX-M-15産生大腸菌ではIncI1を保有する菌株が多く認められたことから、IncI1のpMLST型別による由来別の疫学的傾向を比較したところ、ヒト・鶏肉・鶏由来では共通してCC-3が多く認められること、さらにいずれもCTX-M-1型が多く見られることが示された。鶏肉由来株のCC-3型IncI1は接合伝達性を示すことから、鶏—鶏肉—ヒトにおける水平伝播にはCC-3型IncI1が寄与している可能性が示唆された。

市販鶏肉から分離されたVRE菌株では、昨年度同様、ヒト臨床分離株の遺伝特性との差異が認められることから、ヒト健康危

害の影響は少ないと想定された。しかし、ヒトへの危害となり得る VRE が鶏肉から検出された事例が少なからずとも存在するため、今後も市販鶏肉における VRE の危害分析を継続する必要があると考えられた。

E. 結論

ヒトへの ESBL 産生大腸菌の伝播には鶏肉が最も重要である可能性が示唆され、その一つとして、接合伝達性である CC-3 型 IncII プラスミドによる伝播リスクが推測された。一方で、VRE によるヒト健康危害の影響は少ないと考えられたが、今後さらなる危害分析を行う必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山本詩織、朝倉 宏、五十君静信：基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌に関わる最近の動向とその拡散に関する考察～食品汚染実態とその危害性について～、食品衛生学雑誌、印刷中

2. 学会発表

- 1) 山本詩織、朝倉 宏、岡田由美子、吉田麻利江、五十君静信：国内の市販鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌が保有する IncII プラスミドの分子疫学的傾向とその特性について、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月、宮城
- 2) 山本詩織、吉田麻利江、岡田由美子、朝倉 宏、五十君静信：市販鶏肉における ESBL 産生大腸菌及び VRE の汚染実態と分離株の遺伝特性について、日本防菌防黴学会第 43 回年次大会、2016 年 9 月、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. ESBL 産生大腸菌および VRE 株の産地別陽性率

産地	ESBL 産生大腸菌株			VRE 株		
	陽性数	供試検体 数	陽性率 (%)	陽性数	供試検体 数	陽性率 (%)
北海道	2	3	66.7	1	1	100.0
青森	6	9	66.7	5	6	83.3
岩手	17	19	89.5	11	13	84.6
群馬	1	1	100.0	1	1	100.0
千葉	2	2	100.0	1	1	100.0
鳥取	2	3	66.7	1	2	50.0
佐賀	2	3	66.7	0	1	0.0
宮崎	11	11	100.0	4	4	100.0
鹿児島	6	9	66.7	5	7	71.4
小計 (国産)	49	60	81.7	29	36	80.6
ブラジル	16	16	100.0	6	11	54.5
アメリカ	0	5	0.0	1	4	25.0
タイ	2	6	33.3	3	3	100.0
小計 (輸入)	18	27	66.7	10	18	55.6
総計	67	87	77.0	39	54	72.2

表 2. ESBL 産生大腸菌が保有する耐性遺伝子型とプラスミドレプリコン型

耐性遺伝子型	株数	プラスミドレプリコン型	株数
CTX-M-1	1	-	1
CTX-M-2	22	11, FIB, P, F	1
		11, FIB, F	3
		FIB, A/C, F	1
		FIB, P, F	1
		N, FIB, F	1
		FIB, F	8
		F	2
		-	5
CTX-M-9	18	11, FIB, F	2
		FIB, F	14
		F	1
		-	1
CTX-M-15	1	FIB, F	1
CTX-M-1 および CTX-M-15	19	11, FIB, F	7
		N, FIB, F	3
		11, F	2
		FIB, F	3
		11	3
		P	1
CTX-M-2 および CTX-M-9	1	FIB, F	1

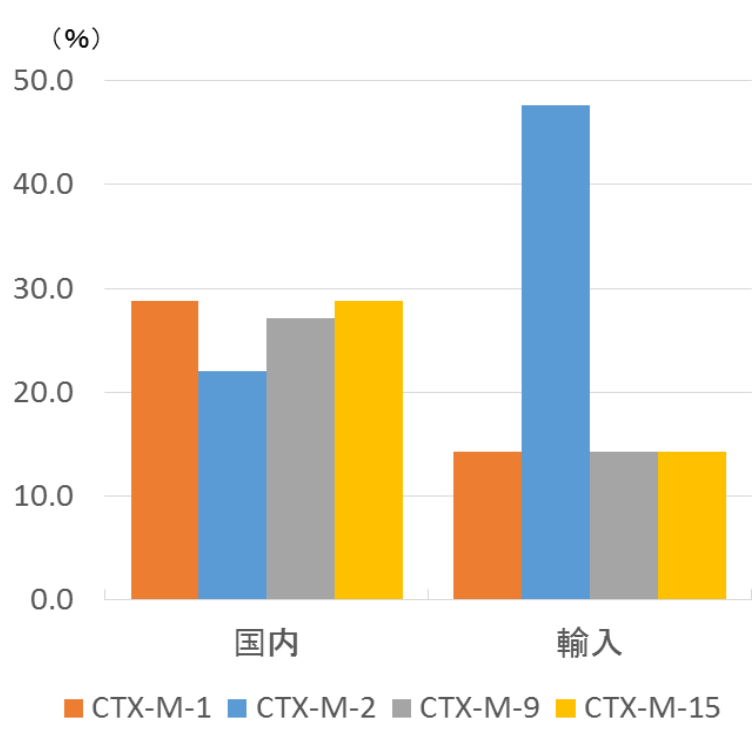


図 1. 国産鶏肉と輸入鶏肉別の ESBL 産生遺伝子型別

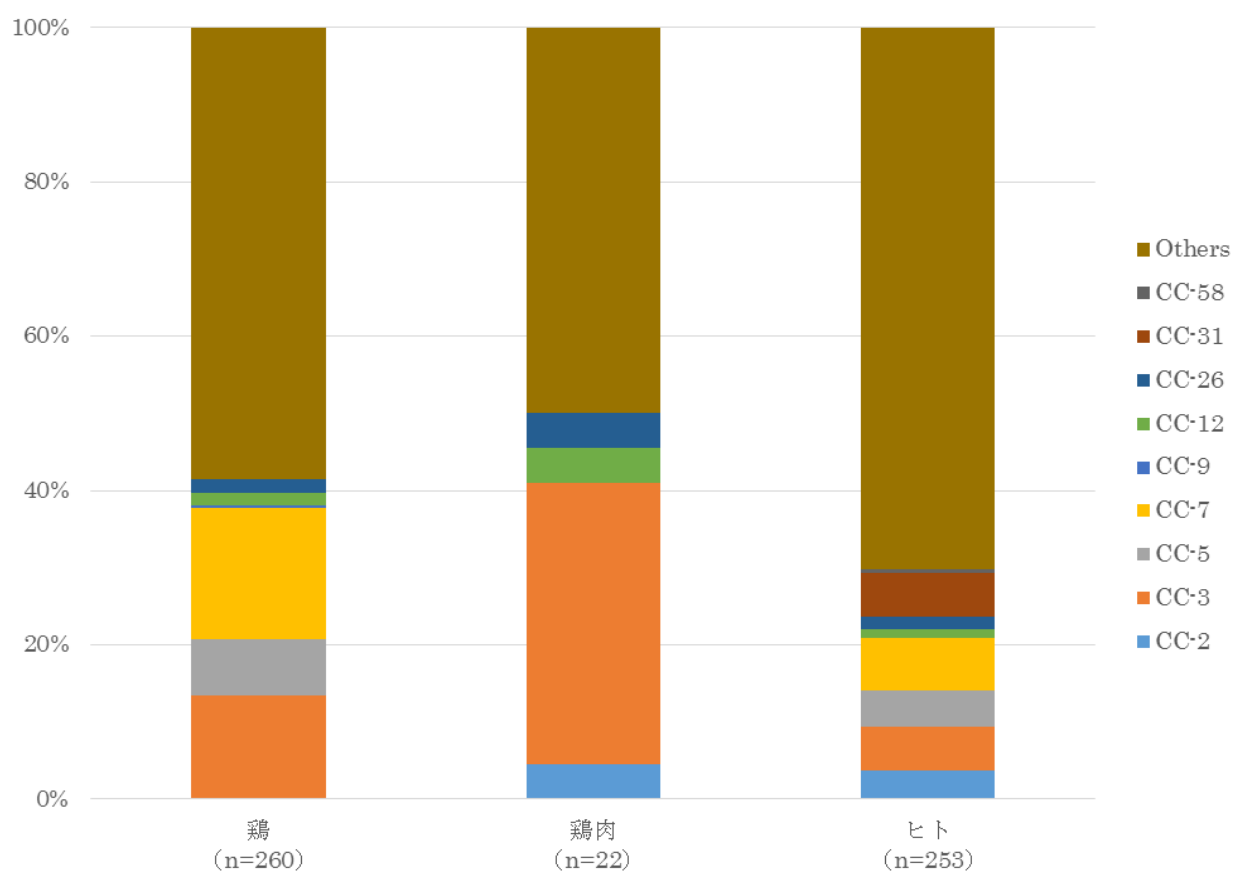


図 2. 由来別 IncII プラスミドの pMLST 型別の比較

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 28 年度 分担研究報告書

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 JANIS 事業と JVARM の連携;食品

研究分担者 柴山 恵吾 （国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

研究要旨

食品由来のサルモネラ等の薬剤耐性に関する集計ツールを作成するため、その準備としてまず地方衛生研究所で実施されている人検体由来のサルモネラ属菌の集計プログラムを作成し、JANIS が通常作成しているレポートの形式で表示するようにして今後汎用できるようにした。地方衛生研究所が収集し解析しているサルモネラ属菌の薬剤感受性試験の結果データファイルの様式にもとづき、ABPC、CTX、GM、KM、IPM、NFLX、CPFX、NA、ST、MEPM、CAZ、FOM、CFX、AMK、SM、TC の耐性、中間、感性の割合を JANIS レポート形式で表示するようにした。そして地方衛生研究所が 2015 年に収集し薬剤感受性試験を実施した 388 菌株のデータを実際に集計した。これらの薬剤のうち耐性(R)の割合が特に高かったものとして TC が 22%、SM が 27%、ABPC が 17%などだった。CTX、CAZ、CPFX は耐性の割合は 0%だった。なお、検体は主に便だった。O 抗原では O 4 群が 41%を占めており最も多く、その他 O 7 群が 21%、O 9 群が 11%、O 8 群が 9%などだった。さらに、便由来のサルモネラについては WHO が実施している薬剤耐性サーベイランス (GLASS) に提出するデータの作成ツール開発を行った。GLASS は薬剤耐性に関して性別、年齢別に層別化したデータを求めている、そのデータを GLASS が指定する様式で提出する必要があるため、GLASS 提出ファイル作成のツールを作成した。現在、このツールで層別化した集計を行っている。なお、GLASS はサルモネラ属菌については血液由来のデータも求めているため、JANIS のデータベースから必要なデータを抽出するとともにこれについても別途解析プログラムを作成した。2015 年に JANIS 参加医療機関から提出されたデータでは、男性、女性全ての年齢層で血液から分離されたサルモネラの薬剤耐性の割合は、IPM は 0%(0/504)、MEPM は 0%(0/513)、CTX は 0%(0/405)、CTR は 0.3%(1/363)、CAZ は 0%(0/529)、LVFX は 0.3%(2/572)、CPFX は 0%(0/224)だった。地方衛生研究所が収集、解析している人便由来株のデータとほぼ同様の結果と考えられる。血液由来サルモネラについても、現在 GLASS に提出のため層別化した集計を進めている。

A. 研究目的

ワンヘルスアプローチによる薬剤耐性サーベイランス体制構築を目的として、食品由来の病原細菌の薬剤耐性に関するデータを JANIS のレポートと同様の形で作成し、比較できるようなツールを作成する。今年度はその準備として、地方衛生研究所が収集、解析している人検体由来のサルモネラ属菌の薬剤感受性試験のデータについて、JANIS と同様の形式のレポートを作成するツールを作成することとした。また、WHO は Global な薬剤耐性サーベイランス (GLASS) を 2015 年から開始し、各国にデータの提出を求めている。GLASS はまず人由来検体から始め、将来的に食品由来検体も加えることが検討されている。このため、GLASS

が求めるデータを提出できるように集計を行うとともに、GLASS が指定するファイル形式のデータを作成するツールを作成することとした。今年度は上記のヒト便由来サルモネラの薬剤耐性に関するデータを用いて GLASS が求める集計を行い、GLASS のファイル形式でデータファイルを作成することとした。また、GLASS は人血液検体由来のサルモネラについても同様に報告を求めている。血液検体由来のサルモネラについては、JANIS のデータベースから必要なデータを抽出し、集計するツールを作成することとした。

B. 研究方法

地方衛生研究所が収集、解析している人検体由

来のサルモネラ属菌の薬剤感受性試験結果のデータを愛媛県立衛生環境研究所に集約し、統一した様式にとりまとめた（四宮博人所長）。このデータファイルをもとに、感染研において ABPC、CTX、GM、KM、IPM、NFLX、CPFX、NA、ST、MEPM、CAZ、FOM、CFX、AMK、SM、TC の耐性、中間、感性の割合を JANIS レポート形式で表示するようにした。また、O 抗原の割合も表示するようにした。さらに、WHO が実施している薬剤耐性サーベイランス (GLASS) に提出するデータの作成ツール開発を行った。GLASS は薬剤耐性に関して性別、年齢別に層別化した各種薬剤感受性データを求めており、そのデータを GLASS が指定する様式で提出する必要があるため、GLASS 提出ファイル作成のツールを作成した。なお、GLASS はサルモネラ属菌については血液由来のデータも求めているため、JANIS のデータベースから必要なデータを抽出するとともにこれについても別途解析プログラムを作成した。

（倫理面への配慮）
患者情報は取り扱わない。

C. 研究結果

地方衛生研究所が収集、解析している人検体由来のサルモネラ属菌の薬剤感受性試験結果のデータを愛媛県立衛生環境研究所に集約し、統一した様式にとりまとめた（四宮博人所長）。データは、分離年、検体名称、性別、年齢、症状の有無、薬剤感受性結果（ディスク法の阻止円径ならびに判定結果）を集計した。協力地研で 2015 年に収集された 388 株の解析結果が得られた。このデータファイルをもとに、JANIS が通常作成しているアンチバイオグラムと同様のレポートを作成するようにして、集計を行った。アンチバイオグラムを図 1 に示す。耐性 (R) の割合が特に高かったものとして TC が 22%、SM が 27%、ABPC が 17% などだった。CTX、CAZ、CPFX は耐性の割合は 0% だった。なお、同時に O 抗原の割合も集計することとした。O 抗原では O 4 群が 41% を占めており最も多く、その他 O 7 群が 21%、O 9 群が 11%、O 8 群が 9% などだった（図 2）。

さらに GLASS のための集計ツールならびに提出用ファイルの作成を行った。ツールは、来年以降もそのまま利用できるような汎用性があるものとした。GLASS は、性別、年齢別（1 歳未満、1 歳から 4 歳、5 歳から 14 歳、15 歳から 24 歳、25 歳から 34 歳、35 歳から 44 歳、45 歳から 54 歳、55 歳から 64 歳、65 歳から 80 歳、81 歳以上、ならびに全ての年齢）、入院外来別

についてデータの層別化を求めている。これらの層別化集計ツールを作成した。年齢、性別の各階層ごとに、各薬剤の感受性試験結果を集計するようにした。さらに、集計結果を GLASS が指定する文字列に変換し、Tab 区切りのテキストファイルで保存するツールを作成した。現在、層別化の集計を実施中である。

血液検体由来サルモネラについては、JANIS データベースから該当データを抽出し、集計するツールを作成した。便検体由来と同様の形でデータを層別化するツールを作成した。現在集計ツールの最終確認を行っている。2015 年に JANIS 参加医療機関から提出されたデータでは、男性、女性全ての年齢層で血液から分離されたサルモネラの薬剤耐性の割合は少なく、IPM は 0% (0/504)、MEPM は 0% (0/513)、CTX は 0% (0/405)、CTR は 0.28% (1/363)、CAZ は 0% (0/529)、LVFX は 0.35% (2/572)、CPFX は 0% (0/224) だった。

JANIS は比較的大規模の病院が多く参加していることから、便検体由来サルモネラについてはデータの代表性が十分に保証されないが、参考情報として同様に集計を行った。結果、2015 年に JANIS 参加医療機関から提出されたデータでは、男性、女性全ての年齢層で便から分離されたサルモネラについても薬剤耐性の割合は少なく、IPM は 0.03% (1/2626)、MEPM は 0.07% (2/2724)、CTX は 2.35% (51/2171)、CTR は 2.14% (41/1913)、CAZ は 1.39% (39/2796)、LVFX は 0.88% (26/2932)、CPFX は 1.31% (16/1225) だった。地方衛生研究所が収集している人便由来株のデータとほぼ同様の結果と考えられる。

D. 考察

地方衛生研究所が収集、解析している人検体由来のサルモネラ属菌の薬剤感受性試験結果のデータを JANIS が通常作成しているレポートと同じ形のアンチバイオグラムで作成した。また、WHO が実施するサーベイランス GLASS のための集計ならびに提出用ファイル作成ツールを作成し、現在集計を進めている。人血液由来サルモネラについては、JANIS のデータベースから集計を行い、同様に GLASS ための集計ツールを作成した。現在提出用ファイルを作成している。また、同じ集計ツールを用いて人便由来サルモネラについても集計を行った。いずれも、薬剤耐性の割合は同様の結果を示した。現在、集計ツールの最終確認を行っている。年度内には全ての集計を終了し、GLASS にデータを提出する予定である。

E. 結論

人の便または血液由来サルモネラにおいては、TC、SM、ABPC などで耐性の割合が高いが、CAZ、

CTXなどのセファロスポリン系薬剤やCPFXなどフロオロキノロンについては耐性が 0%または非常に低い水準だった。これらのデータをさらに層別化して集計し、最終確認後に WHO に提出する予定である。将来的には、食品由来の菌株の薬剤耐性データについてもこの解析ツールを使用して集計を行う予定である。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他

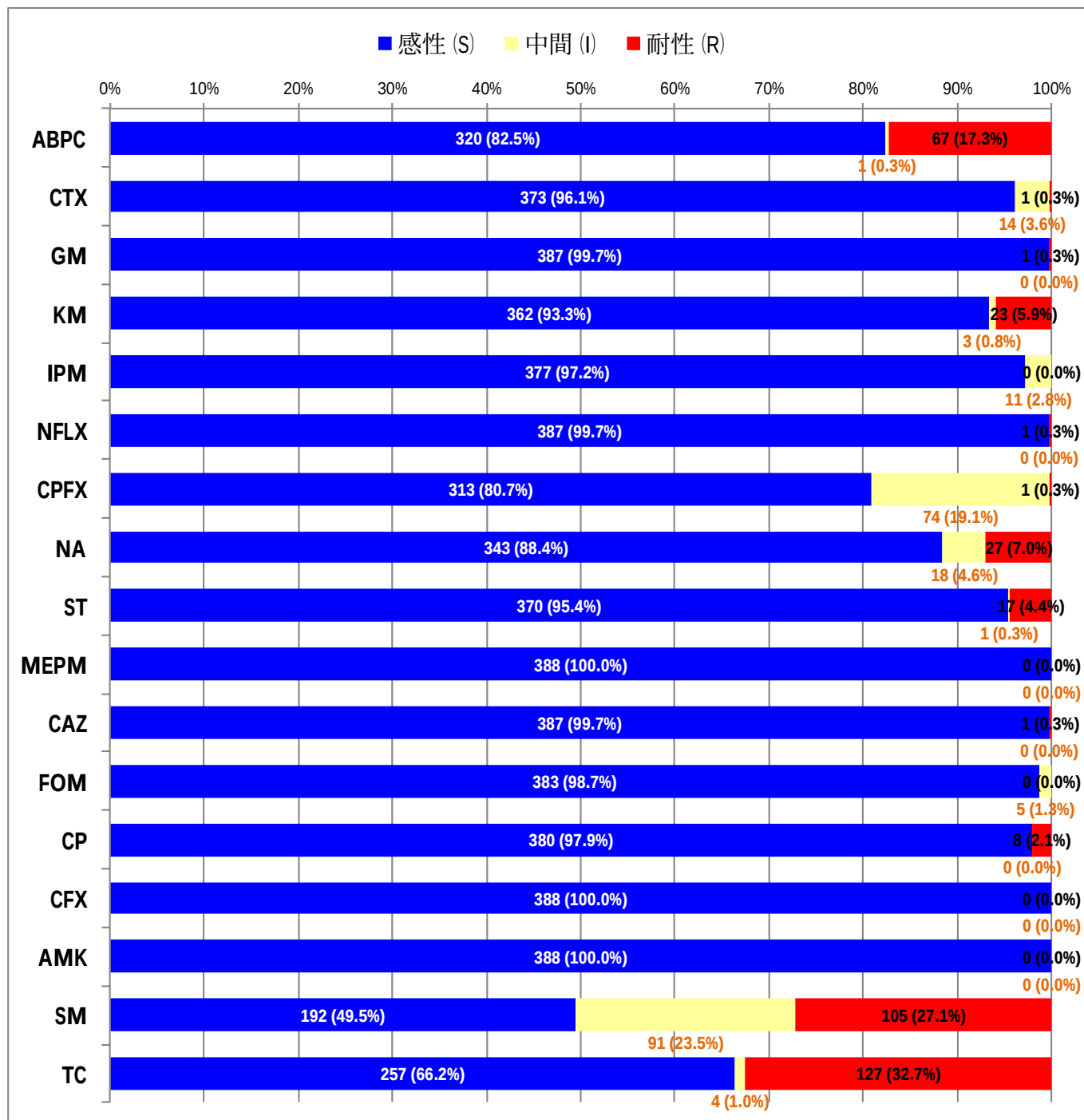


図1 地方衛生研究所で収集、解析されている人検体由来サルモネラ（2015年）の薬剤感受性

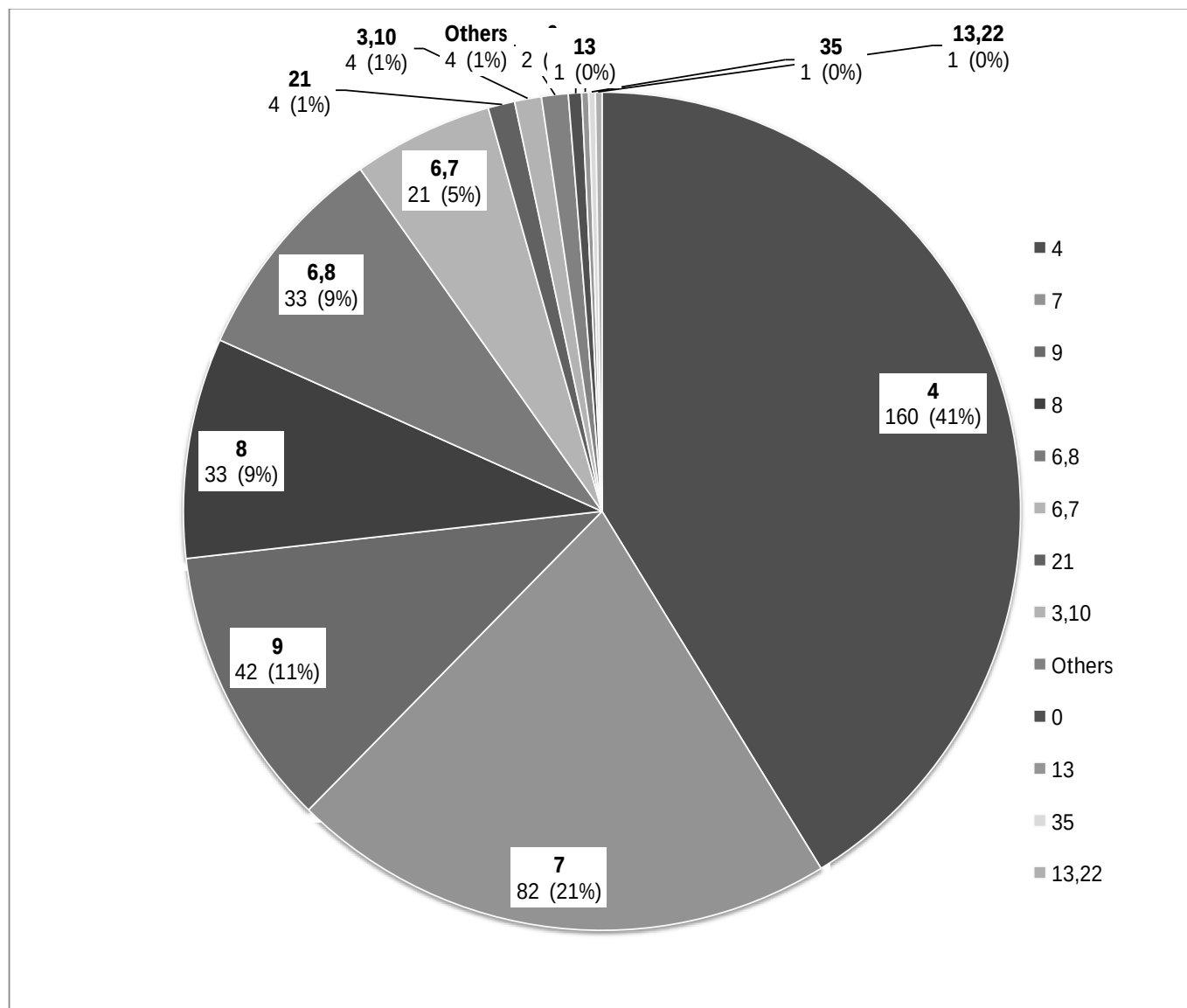


図2 地方衛生研究所で収集、解析されている人検体由来サルモネラ（2015年）のO抗原の内訳
 グラフ中、O抗原群の数字を太文字で示し、下に菌株数と割合（%）を示した。

食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 非チフスサルモネラ症の起因菌の薬剤耐性に関する研究

研究分担者 大西 真 （国立感染症研究所・細菌第一部・部長）
研究協力者 泉谷秀昌 （国立感染症研究所・細菌第一部・室長）

研究要旨

この研究では、サルモネラヒト由来株に焦点をあてて解析する体制構築を目指した。食品からヒトへの菌の伝播を考えるうえで重要な健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った。

A. 研究目的

腸チフス、パラチフスを除くサルモネラ（non-typhoidal Salmonella, NTS）症は食中毒の中で件数、患者数とも上位を占めることが知られている。また、食品由来感染症（食中毒として捉えることができない事例を含む）としても、カンピロバクター感染症とともに未だ多数の症例が国内で存在することが推定されている。サルモネラ属菌による食品由来推定患者数は年間 14～25 万人程度（2005～2008）とされている（平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業『食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究』：分担研究「宮城県における積極的 食品由来感染症病原体サーベイランスならびに急性下痢症疾患の実被害者数推定」 分担研究者 窪田邦宏、春日文子、2010、p. 117-136.）。

大規模流通食品の汚染が、直接大規模事例につながる危険がある。そのため、散发例の把握、食品汚染の実態の把握からリスク要因を抽出し、NTS 対策の効率化、高度化が望まれる。また、薬剤感受性プロファイルを理解することで、NTS の動物-ヒト間の伝播の様子を探る上でも分離株の詳細な検討が必要である

本研究では、国立感染症研究所で収集さ

れた NTS 株の整理をするとともに、健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った

B. 研究方法

収集菌株情報の整理

細菌第一部において 2010 年から 2015 年にかけて検査依頼を受けた NTS について、解析株数、血清型情報、血清型ごとの薬剤感受性試験結果について整理を行った。

健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制の構築

業務従事者の検便を実施している検査会社から、2015 年に分離された血清群 04 の株の分与を受け、これについて H 型別及び薬剤感受性衛研を行った。

倫理面への配慮

いずれも菌株のみの解析であり、個人情報 は連結不可能匿名化されている。

C. 研究結果

健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制の構築

昨年度実施した業務従事者の検便を実施している検査会社と面談から、04 群の増加

傾向が認められた。そこで、当該検査会社から 2015 年に分離された 04 群の 300 株について H 型別及び薬剤耐性の分布を調べた。その結果、Shwarzengrund、04:i:-、Saintpaul、Agona、Stanley、Typhimurium、Braenderup、Chester、Bredeney、Derby など多様な血清型が同定された。各血清型の分布を図 1 に示した。

上記血清型における薬剤耐性の分布を図 2 に示した。いずれの薬剤にも感受性であった株の頻度は

Bredeney	100%
Chester	100%
Brandenburg	88%
Stanley	82%
04:i:-	5%
Shwarzengrund	6%

において高く、
において低かった。

全体の耐性率の高い薬剤は

TC	51%
SM	46%

であり、CPFX、CTX、CAZ、FOM は 1%以下であった。

ABPC は 04:i:-、Typhimurium において耐性率が高かった（それぞれ 79%、63%）。KM は Schwarzengrund において耐性率が高かった（69%）。

血清型 Schwarzengrund 及び 04:i:-に関し、昨年度整理した感染研保有株と、薬剤耐性パターンの比較を行った（図 3、図 4）。Schwarzengrund に関しては、両者の間に大きな違いは見られなかった。一方、04:i:-に関しては、保菌者株の耐性率が高く、ABPC、SM、TC3 剤耐性株が 6 割以上を占めた。

D. 考察

サルモネラ属菌は様々な動物へ適応することでその多様性を獲得してきたと考えられている。各血清型のサルモネラ属菌の宿主域により、リスク食品や接触感染のリスクが規定される。ヒトへは、食品を介する感染が主であり、一部ヒトと動物の接触に

よるヒト感染が存在する。ヒトーヒトの直接感染のリスクは腸チフス原因菌（チフス菌、パラチフス菌）ほど明確ではないが、調理従事者の保菌が食品の汚染の原因となることは否定できない。

サルモネラ属菌がヒト腸管内に存在している状態（健康保菌）についての知見には限りがある。本研究では、これらの分離株を詳細に解析することでサルモネラ属菌の耐性化機構の一つの側面を考察することを目的としている。

健康保菌者由来サルモネラ 04 群菌 300 株の解析の結果、多様な血清型が存在することが示された。分離頻度が高いものとして Schwarzengrund、04:i:-、Saintpaul、Agona、Stanley、Typhimurium、Braenderup、Chester、Bredeney、Derby で 92%を占めていた。一方で、今回の解析では 04 群のみを対象に解析を実施しているが、多様なサルモネラによる健康保菌が存在していることがうかがわれた。

薬剤耐性の分布では、高い確率で感受性が保たれている血清型（Bredeney、Chester、Brandenburg、Stanley）、と感受性株がほとんど存在しない血清型（Schwarzengrund、04:i:-）が存在した。また、薬剤別では全体としては TC および SM が高い耐性率を示した。注目すべきは血清型によって ABPC 耐性率、あるいは KM 耐性率が高いことが示されたことである。また、04:i:-に関しては、患者由来株（感染研保有株）との比較で、保菌者株の耐性率が高かったことである。2015 年分離株のみの解析であることから、更に解析対象を広げて検証することが必要である。

E. 結論

検便検査会社の協力をえて、04 群サルモネラ属菌の性状解析を実施するための体制の構築を始め、300 株の性状解析が実施した。多様なサルモネラが健康保菌者から分離されていることが示された。今後の解析の参照として重要な知見であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

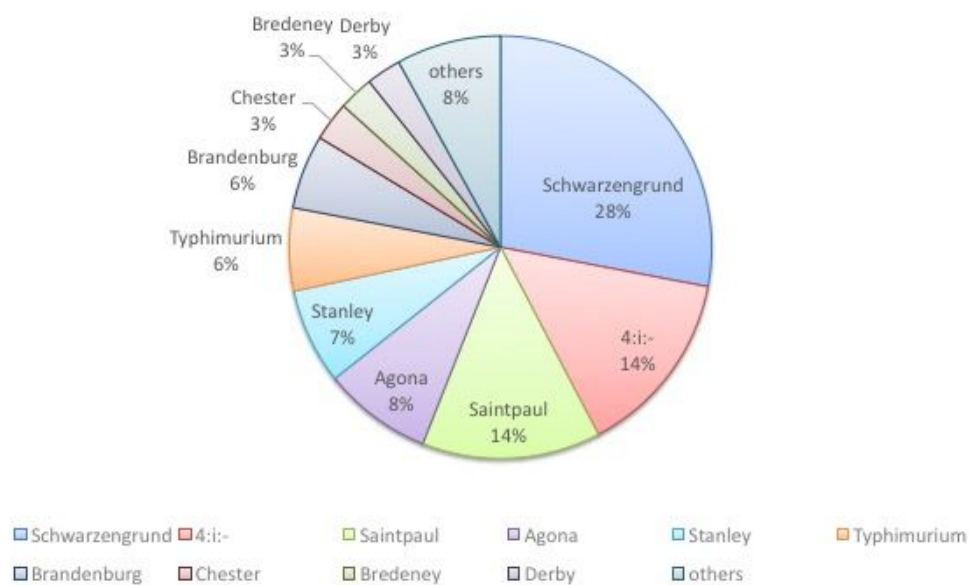
1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし。

図1 サルモネラ 04群 健康保菌者由来株の血清型分布

保菌者2015血清型分布



N=300

図2 サルモネラ 04群 健康保菌者由来株の耐性率

保菌者2015耐性率

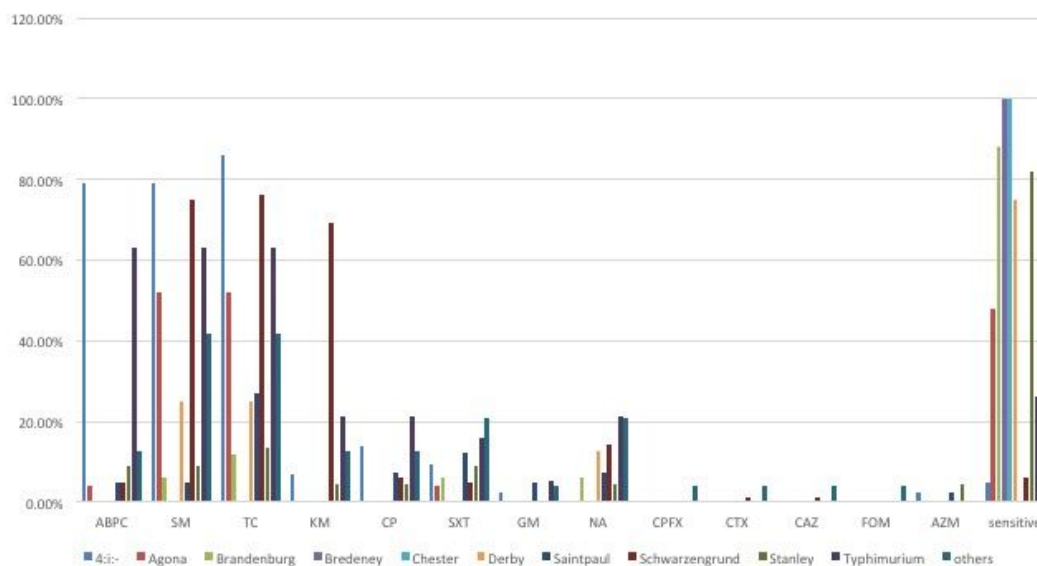
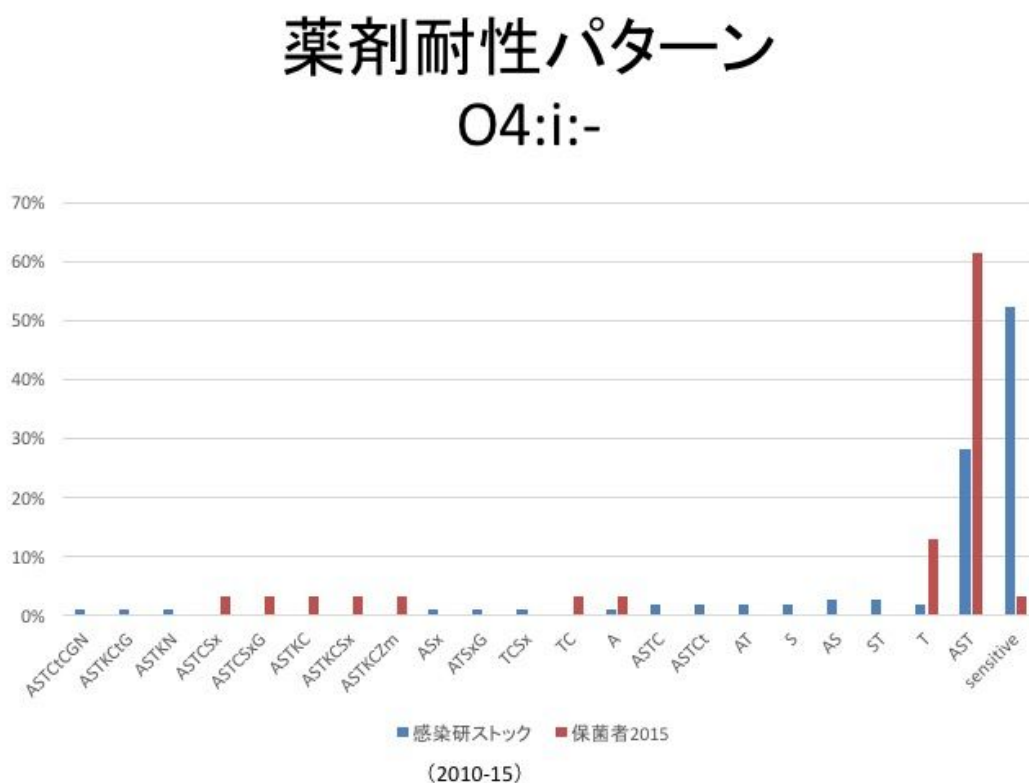


図3 *Salmonella* Schwarzengrund の薬剤耐性パターン



図2 *Salmonella* 04:1:- の薬剤耐性パターン



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 28 年度 分担研究報告書食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究
分担課題 食品由来の多剤耐性菌（ESBL/AmpC 産生菌、VRE など）の疫学調査

研究分担者 富田 治芳（群馬大学大学院医学系研究科・細菌学・教授）
研究協力者 谷本 弘一（群馬大学大学院医学系研究科・薬剤耐性菌実験施設・准教授）

研究要旨

この研究では、環境（家畜、食肉）からヒトへの伝播・拡散が危惧される多剤耐性腸内細菌科菌（ESBL 産生菌、AmpC 産生菌）およびバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）について国内で流通する食肉検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。2015 年度（2016 年 2～3 月）に収集した国内産食肉（鶏肉）150 検体、輸入食肉（鶏肉）76 検体の合計 226 検体を調査した。ESBL 産生菌は 37 検体陽性（16.4%）、AmpC 産生菌は 39 検体陽性（17.3%）であり、それらの分離頻度は昨年度までと比較し、いずれも低いものであった（昨年度は ESBL 産生菌 52.9%、AmpC 産生菌 59.5%の検出率）。ESBL 産生菌は輸入鶏肉から高頻度で検出され（国内産 8.7%、輸入 31.6%）、一方 AmpC 産生菌の検出率は国内産が 23.3%、輸入食肉が 5.3%と国内産鶏肉の方が高かった。耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型（50.0%）、TEM 型（18.8%）が多く、輸入肉では CTX-M 型（86.0%）が多かった。CTX-M 型遺伝子として国内産は CTX-M2、輸入食肉は CTX-M2 と CTX-M8/25 が主に分離された。AmpC 型遺伝子としては CIT が主に検出された。これら食肉から分離される多剤耐性腸内細菌科細菌の 9 割以上は大腸菌であったが、病原性細菌であるサルモネラ属菌が 1 株検出された。VRE については、今年度は高度バンコマイシン耐性の VanA 型や VanB 型 VRE 株は国内外の鶏肉検体からは検出されなかった。しかし、新規の VanN 型 VRE が国内産鶏肉 1 検体から検出された。VanN 型株の PFGE 解析と MLST 解析から、この株は過去に分離された国産鶏肉由来 VRE 株と同一の起源であった。

A. 研究目的

1) 臨床では多剤耐性の腸内細菌科菌（大腸菌、肺炎桿菌など）が急激に増加している。特に抗菌薬として最も多く使用されている β -ラクタム剤に対して高度耐性を示す ESBL 産生菌、および AmpC 産生菌の増加が深刻な問題となっている。これら多剤耐性腸内細菌科菌は環境（家畜）から畜産物、特に食肉を介してヒトへ伝播、拡散する危険性が指摘されている。本研究では食肉のこれら多剤耐性腸内細菌科菌の調査・解析を行い、その関連性を科学的に明確にすることを目的とした。

2) 多剤耐性のバンコマイシン耐性腸球菌 VRE は欧米で院内感染症の主な起因菌として深刻な問題となっている。ヨーロッパにおいては過去の家畜への肥育目的の抗菌薬（アボパルシン）使用による環境中での VRE の増加とそのヒトへの伝播、拡散が指摘されている。幸い日本国内では VRE の分離頻度は欧米に比較し低い、近年、増加中であり複数件のアウトブレイクが臨床報告されている。しかし国内ではこれまで VRE に関する耐性機構の解析、伝播・拡散機構の解明、分子疫学研究は十分に行われていない。本研究では環境（家

畜、食肉）由来 VRE と臨床分離 VRE との関係を明らかにする目的で、国内食肉における VRE の調査と解析を行った。

B. 研究方法

食肉検体（表 1）：国内産食肉は国内 3 ヶ所の食肉検査所からそれぞれ鶏肉 30 検体を収集した。海外食肉は各年度に検疫所で取り扱う輸入鶏肉（ブラジル産 39 検体、米国産 8 検体、タイ産 8 検体、フィリピン産 6 検体の合計 61 検体）を収集した。各施設から送付された検体は速やかに凍結保存とし、順次融解の後、解析を行った。

検出方法：

1) ESBL 産生菌および AmpC 産生菌（腸内細菌科菌）の検出

国内の食肉衛生検査所で採集された肉の拭き取り材料を用いた。輸入肉はミンチ肉を用いた。それぞれ ABPC 添加（80mg/L）LB 液体培地 3 ml で一夜培養し、0.1 ml を二種類の薬剤添加 DHL 寒天培地（CAZ を 1 mg/L または CTX を 1mg/L 含む）に塗布した。それぞれの平板上の発育コロニーを 2 個ずつ鈎菌し、純培養後チトクロム・オキシダーゼ試験陰性菌のみを選択した。CTX、CAZ に対する

MIC 値 2mg/L 以上の株についてさらに 2 薬剤阻害実験を行った。ESBL 産生確認のために CTX, CAV, CAZ ディスク、AmpC 産生確認のために CTX, ボロン酸, CAZ ディスクをそれぞれ用いたディスク拡散法 (DDST) を行った。各々の耐性遺伝子型 (ESBL; TEM, SHV, CTX-M, および AmpC; MOX, CIT, DHA, ACC, EBM, FOX) の確認には各種特異的プライマーを用いた PCR 法を用いた。

上記の方法で分離された耐性株について耐性の接合伝達実験を行なった。受容菌として大腸菌実験株 C600 (アザイド耐性) を用い、膜フィルターを用いた接合伝達 (37°C、8 時間培養) を行った。選択培地には CTX または CAZ をそれぞれ 1 µg/mL とアザイド 250mg/L を含む寒天平板を用いた。接合伝達性を認めた株については、プラスミドのレプリコン型を PCR 法によって調べた。

2) VRE の検出

培地；腸球菌分離には Enterococcosel Broth (BBL)、Bile Esculin Azide agar (Difco) および Brain Heart Infusion agar (Difco) を使用。

用いた薬剤；バンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC)

腸球菌の分離；VRE 検出のための選択的方法を用いた。検体のガーゼのふき取りサンプル、ミンチ肉片を、VCM 4mg/L 加 Enterococcosel Broth で 48 時間選択的増菌後、VCM 4mg/L 加 Bile Esculin Azide agar 選択培地に塗布し、得られたコロニーを VCM 4mg/L 加 Brain Heart Infusion agar 上で単集落分離を行うことにより選択した。ミンチ肉浸潤液 0.1ml を VRE 選択寒天培地に塗布した。選択用寒天平板の培養時間はすべて 37°C、48 時間培養。薬剤耐性検査は薬剤平板希釈法を用い、接種菌液は 1 夜液体培地培養後の菌を 100 倍希釈することにより用いた。VRE の検出には vanA, vanB, vanC1, vanC2/3, vanN, 各種 *ddl* の特異的プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法を用いた。必要に応じて DNA シークエンス解析 (Big Dye primer 法)、PFGE 解析、MLST 解析を行った。

(倫理面への配慮)

全ての臨床分離株は患者個人を同定できる情報を含まない検体として収集し、本研究に用いた。

C. 研究結果

1) ESBL 産生菌および AmpC 産生菌の調査・検出のために 2015 年度 (2016 年 2 月～3 月) に収集した国内産鶏肉 150 検体、輸入鶏肉 76 検体の合計 226 検体を解析した (表 1)。このうち宮崎から送付された検体数が 80 検体と予定数よりも多く含まれている。これは当初送られてきた 40 検体からの菌の検出率が極めて低いために、再度、

40 検体からの拭き取りを追加依頼したためである。二度目の送付検体からの菌の検出率は幾分改善したものの、昨年度までの検出率と比較し、低いものであった。そのため、今回の結果には宮崎県から最初に送られてきた 40 検体分は結果に含んでいることが昨年度の場合とことなる。昨年度は、送付された検体が感想気味で菌の検出が認められなかった鹿児島からの検体を除外した結果となっていた。

ESBL 産生菌は 37 検体陽性 (16.4%)、AmpC 産生菌は 39 検体陽性 (17.3%) であり、それらの分離頻度は昨年度までと比較し、いずれも低いものであった (昨年度は ESBL 産生菌 52.9%、AmpC 産生菌 59.5% の検出率)。ESBL 産生菌は輸入鶏肉から高頻度で検出され (国内産 8.7%、輸入 31.6%)、一方 AmpC 産生菌の検出率は国内産が 23.3%、輸入食肉が 5.3% と国内産鶏肉の方が高かった (表 2、表 6)。耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉では CTX-M 型 (50.0%)、TEM 型 (18.8%) が多く、輸入肉では CTX-M 型 (86.0%) が多かった (表 3、表 7)。CTX-M 型遺伝子として国内産は CTX-M2、輸入食肉は CTX-M2、CTX-M8/25 が主に分離された (表 4、表 8)。AmpC 型遺伝子としては国内国外ともに CIT が主に検出された (表 5、表 9)。食肉から分離される耐性株の遺伝子型の傾向はこれまでの調査と同じであった (表 10)。

鶏肉由来 ESBL および AmpC 産生株 (国内産鶏肉由来 42 株と輸入鶏肉由来株 28 株) の合計 70 株について、膜フィルター上で大腸菌実験株との接合伝達実験を行なった。その結果、いずれの耐性遺伝子型も約半数が伝達性を示し、耐性遺伝子が伝達性プラスミド上に存在していることが示唆された (表 11)。そのうち 37 株についてプラスミドのレプリコン型を解析したところ、約半数の 19 株が K 型であった (表 12)。

ESBL 産生株、AmpC 産生株 (合計 70 株) の菌種としては *Escherichia coli* が最多であり (67 株 96%)、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter cloacae*、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* がそれぞれ 1 株分離された (表 13)。これまでの本調査において、食肉検体から病原性細菌であるサルモネラ属菌が多剤耐性腸内細菌科細菌として分離されたのは初めてであった。尚、この株の血清型は 16S rRNA の塩基配列の解析結果から、Newport 株であることが判明した。

一方、VRE について、今年度は高度バンコマイシン耐性を示す VanA 型や VanB 型 VRE 株は国内外の鶏肉検体からは検出されなかった。しかし、国内産鶏肉 1 検体から VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された (表 14)。VanN 型 VRE は我々が 2011 年に収集した国内産鶏肉から分離し、世界で 2 例目として (環境中からは初めて) 報告した新型 VRE

である。今回の調査で国産鶏肉検体から分離された VanN 型 VRE 株について PFGE 解析を行ったところ、これまでに本調査で報告してきた VanN 型 VRE 株 *E. faecium* 株と極めて類似の PFGE パターンを示した(図 1)。また MLST 解析を行ったところ、これらは全て ST669 に分類された(図 1、表 15)。これらの結果は今回検出した VanN 型株が以前に分離された株と同一の起源を持つことを示している。

D. 考察

今回の調査結果として、昨年度までの本調査と比較し、ESBL 産生菌、AmpC 産生菌の分離頻度が全体的に低下していた。昨年度は、検出方法を改善し(Ampicillin を添加した液体培地で前培養を行なう工程を追加)、その結果、検出率が上がった。今年度も同様の検出方法を行なったが、検出率は低いものであった。国内産鶏肉検体でも群馬の検体(採取後直ちに当施設へ検体を持参)からは腸内細菌科細菌および腸球菌の分離頻度が極めて高いこと、また過去においては他県の検体からも高頻度で耐性菌が検出された年度もあったことから、単に地域による環境汚染状況の差のみとは考え難い。おそらくはサンプリングの方法に依るもの、あるいは検体送付の過程において、菌が死滅することも考えられた。また鶏肉処理場の環境の汚染、あるいはサンプル採取の時期(チラー処理の前後等)に依る違いも考えられる。今後は可能な限り、同一の手法、時期に統一することが望ましい。

VRE に関しては、これまでの調査ではしばしばブラジル産鶏肉から頻度自体は低いものの、臨床で問題となる VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出されていたが、今年度の調査では検出されなかった。グリコペプチド系抗菌薬であるアボパルシンの家畜への投与は 2000 年頃に世界的に禁止されてから、すでに 10 年以上が経過している。VRE による家畜環境の汚染が軽減され、環境中の VRE が減少・消失していることが推測される。一方で今回も日本の鶏肉 1 検体から以前分離した VRE と同一の宿主遺伝子型を持つ VanN 型 VRE 株が分離された。これらの結果は、同一の起源を持つ VanN 型 VRE が低頻度ではあるものの既に国内の環境中に伝播、拡散していることを示唆している。今回国産鶏肉から分離された VRE 株はいずれも VCM の MIC 値 4 mg/L と臨床的に問題となる高度耐性株ではなく、また宿主菌の遺伝子型もヒトに定着し易いとされる型(CC17 等)ではなかった(表 15)。そのため、これらの耐性株がヒトへ伝播しても、ヒト腸管内には定着し難く、また医療上も直ちに大きな問題となる可能性は低いことが予想される。しかし、ヨーロッパでは VanN 型 VRE 株(MIC

値 16mg/L) によるヒト感染(菌血症)も報告されていること、また VanV 型耐性遺伝子は伝達性プラスミド上に存在することから、耐性遺伝子がヒトに定着し易い腸球菌株に獲得された場合には、ヒト環境中に速やかに拡散し、将来的に臨床現場において問題となる可能性は十分に考えられる。VRE についてはそれらを念頭に今後も動向を注意深く監視してゆく必要があるだろう。

E. 結論

国内産鶏肉及びの輸入鶏肉から ESBL 産生または AmpC 産生の多剤耐性腸内細菌科細菌(主に大腸菌)が 16~17%の頻度で検出され、昨年度までと比較し明らかに低下していた。耐性菌による環境の汚染が改善していることが推察される一方で、対象やサンプリング方法の違いによる影響も否定できず、継続的な調査が必要である。

国内産鶏肉検体から、以前の国内分離株と同一起源である VanN 型 VRE 株が分離されたことから、VanN 型 VRE 株の国内の家畜環境中に拡散し定着していることが示唆された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurushima J, Ike Y, Tomita H. Partial Diversity Generates Effector Immunity Specificity of the Bac41-Like Bacteriocins of *Enterococcus faecalis* Clinical Strains. *Journal of Bacteriology*. 198:2379-2390. (2016).

2. 学会発表

- 1) 大竹洋輔、千葉菜穂子、谷本弘一、富田治芳. 鶏肉からの ESBL、AmpC 産生腸内細菌科細菌の分離と解析. 第 10 回若手コロッセウム. 2016 年 8 月 1 日 草津.
- 2) 杉岡佳祐、富田治芳. 食肉由来腸球菌のバシトラシンなどの抗菌性飼料添加物に対する耐性と多剤耐性伝達性プラスミドとの関係について. 第 10 回若手コロッセウム. 2016 年 8 月 1 日 草津.
- 3) 橋本佑輔、久留島潤、野村隆浩、谷本弘一、富田治芳. 腸球菌の VanB 型バンコマイシン耐性に関する研究. 第 10 回若手コロッセウム. 2016 年 8 月 1 日 草津.
- 4) 久留島潤、富田治芳. *Enterococcus faecalis* プラスミドにコードされるバクテリオシン Bac41 の多様性と免疫特異性. 第 10 回若手コ

ロッセウム. 2016 年 8 月 1 日 草津.

2. 実用新案登録	なし
3. その他	なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得	なし
---------	----

表1. 本年度の調査検体(2016年2～3月採取)

国内鶏肉

	鹿児島県	宮崎県	群馬県	合計
検体数	30	80	40	150

輸入鶏肉

	アメリカ	ブラジル	タイ	フィリピン	デンマーク	合計
検体数	20	38	8	8	2	76

表2. 国内鶏肉からのESBLおよびAmpC産生菌の分離

国内鶏肉

生産県 (検体数)	鹿児島 (n=30)	宮崎 (n=80)	群馬 (n=40)	合計 (n=150)
ESBL	3	3	5	11
AmpC	1	0	32	33
ESBL+AmpC	0	0	2	2
合計	3 (10%)	3 (3.8%)	34 (85%)	40 (26.7%)

表3. 国内鶏肉由来ESBL産生株の耐性遺伝子型別

国内鶏肉

生産県 (株数)	鹿児島 (n=4)	宮崎 (n=6)	群馬 (n=6)	合計 (n=16)
TEM	0	0	3	3
CTX-M	3	2	3	8
不明	1	4	0	5

* 同一検体から検出されMIC結果が同じ場合は片方を解析対象とした

表4. 国内鶏肉由来ESBL産生菌のCTX-M型別

国内鶏肉

生産県 (株数)	鹿児島 (n=3)	宮崎 (n=2)	群馬 (n=3)	合計 (n=8)
CTX-M1 group	0	0	1	1
CTX-M2 group	3	0	2	5
CTX-M9 group	0	2	0	2
CTX-M8/25 group	0	0	0	0
不明	0	0	0	0

表5. 国内鶏肉由来AmpC産生株の耐性遺伝子型別

国内鶏肉

生産県 (株数)	鹿児島 (n=1)	群馬 (n=47)	合計 (n=48)
CIT	0	46 *	46
不明	1	1	2

* 群馬株のうち2株は同時にTEMを産生していた

表6. 輸入鶏肉からのESBLおよびAmpC産生菌の分離

輸入鶏肉

輸出国 (検体数)	アメリカ (n=20)	ブラジル (n=38)	タイ (n=8)	フィリピン (n=8)	デンマーク (n=2)	合計 (n=76)
ESBL	1	18	2	3	0	23
AmpC	0	3	0	0	0	3
ESBL+AmpC	0	0	0	1	0	1
合計	1 (5%)	21 (55.3%)	2 (25%)	3* (37.5%)	0	27 (35.5%)

*フィリピンの株では同一検体からESBLのみとESBL+AmpCの両方を検出した株が1株あったため合計の検体数は3となる

表7. 輸入鶏肉由来ESBL産生株の耐性遺伝子型別

輸入鶏肉					
輸出国 (株数)	アメリカ (n=2)	ブラジル (n=33)	タイ (n=2)	フィリピン (n=6)	合計 (n=43)
TEM	0	0	1	0	1
SHV	0	2	0	0	2
TEM+SHV	0	1	0	0	1
CTX-M	2	27	0	2	31
TEM+CTX-M	0	2	0	4	6
不明	0	1	1	0	2

* 同一検体から検出されMIC結果が同じ場合は片方を解析対象とした

表8. 輸入鶏肉由来ESBL産生株のCTX-M 型別

輸入鶏肉				
輸出国 (株数)	アメリカ (n=2)	ブラジル (n=29)	フィリピン (n=6)	合計 (n=37)
CTX-M1 group	0	0	4	4 *
CTX-M2 group	0	17	1	18
CTX-M9 group	0	0	0	0
CTX-M8/25 group	0	9	0	9 * *
不明	2	3	1	6

* TEMも同時に持っていた

* * このうち2株はTEMも同時に持っていた

表9. 輸入鶏肉由来AmpC産生株の耐性遺伝子型別

輸入鶏肉			
輸出国 (検体数)	ブラジル (n=3)	フィリピン (n=1)	合計 (n=4)
CIT	3	1 [*]	4
不明	0	0	0

* フィリピンの1株は同時にTEMを産生していた

表10. 鶏肉由来ESBLおよびAmpC産生株の耐性遺伝子型別

遺伝子型		国内鶏肉	輸入鶏肉	合計
ESBL (n = 46)	TEM	3	1	4
	SHV	0	2	2
	TEM+SHV	0	1	1
	CTX-M1	1	0	1
	CTX-M2	5	18	23
	CTX-M9	2	0	2
	CTX-M8/25	0	7	7
	CTX-M1+TEM	0	4	4
	CTX-M8/25 +TEM	0	2	2
AmpC (n = 47)	CIT	44	3	47
ESBL+AmpC (n = 3)	TEM+CIT	2	1	3
合計		57	39	96

表11. 鶏肉由来ESBLおよびAmpC産生株の耐性伝達性

Sample		耐性伝達株数 (%)
国内鶏肉 (n=42)	ESBL (n = 9)	4 (44)
	AmpC (n = 31)	18 (58)
	ESBL+AmpC (n = 2)	2 (100) *
輸入鶏肉 (n=28)	ESBL (n = 24)	11 (46)
	AmpC (n = 3)	1 (33)
	ESBL+AmpC (n = 1)	1 (100) *
合計 (n = 70)		37 (52.9)

* AmpCはすべてで伝達されているが、ESBLはその限りではない

表12. 耐性伝達性プラスミドのレプリコン型別

Replicon type (amplicon obtained)	国内鶏肉			輸入鶏肉			合計 (n=37)
	ESBL (n=4)	AmpC (n=18)	ESBL+AmpC (n=2)	ESBL (n=11)	AmpC (n=1)	ESBL+AmpC (n=1)	
K	1	14	2	1		1	19
I1	1			3			4
FIB, F	1			1			2
F	1				1		2
FIB, F, K		1					1
FIB, A/C, F, K		1					1
K, B/O		1					1
I1, K		1					1
I1, P, F				1			1
L/M				1			1
I1, P				2			2
N, F				1			1
I1, FIA, FIB, F				1			1

表13. 食肉由来ESBLおよびAmpC産生
腸内細菌科細菌の菌種同定

菌種	株数(n=70)
<i>Escherichia coli</i>	67
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1

菌種同定はBD社 BBLCRYSTAL E/NF同定検査試薬を用いて行った

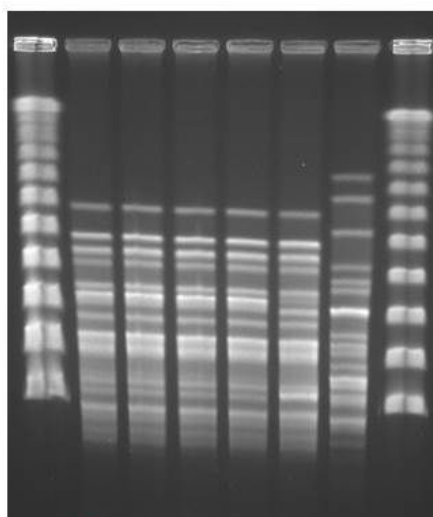
*Salmonella*は16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定しserovar Newportであることを確認した

表14. 輸入鶏肉および国内産鶏肉からのVRE の検出

国名	検体取り扱い 検査所	検体数	VRE が分離された 検体番号	分離した株	遺伝子型	菌種	Glycopeptide耐性値 (MIC, µg/ml)		分離数 (%)
							Vancomycin	Teicoplanin	
ブラジル	神戸	38							0%
アメリカ合衆国	神戸	20							0%
タイランド	神戸	8							0%
フィリピン	神戸	8							0%
デンマーク	神戸	2							0%

県名	取り扱い 検査所	検体数	VRE が分離された 検体番号	分離した株	遺伝子型	菌種	Glycopeptide耐性値 (MIC, µg/ml)(E-Test)		分離数 (%)
							Vancomycin	Teicoplanin	
鹿児島県	鹿児島県大口食 肉衛生検査所	30							0%
宮崎県	宮崎県高崎食肉 衛生検査所	80							0%
群馬県	群馬県食肉衛生 検査所	40	群馬ー3 5	105-1	vanN	<i>E. faecium</i>	4	0.38	2.50%
				105-2			4	0.38	
				105-3			4	0.5	
				105-4			4	0.5	

図1. 今年度群馬県産鶏肉から分離された
VanN型VRE株のPFGEとMLST解析結果



strain	allelic profile							ST
	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	
UCN 71	25	13	9	33	10	19	6	240
AA-22	72	13	9	33	10	19	6	862
GU121-1	9	8	14	58	6	27	6	669
105.1	9	8	14	58	6	27	6	669

表15. これまでに国内産鶏肉検体から分離された
VanN型VRE (*E. faecium*) 株のMLST解析

Year	Location	Strain	Allelic profile							ST
			<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	
2008	France	UCN-71	25	13	9	33	10	19	6	240
2009	Japan/ 宮崎	AA-22	72	13	9	33	10	19	6	852
2011	Japan/ 宮崎	GU121-1	9	8	14	58	6	27	6	669
2014	Japan/ 宮崎	AA-412	9	8	14	58	6	27	6	669
2014	Japan/ 群馬	AA-413	9	8	14	58	6	27	6	669
2015	Japan/ 群馬	AA-425	9	8	14	58	6	27	6	669

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
渡邊治雄	食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応	食品衛生学雑誌	57	156-161	2016
Akther F, Neogi SB, Chowdhury WB, Sadique A, Islam A, Akhter MZ, Joy of Bengal estuary Ohura FT, Ohnishi M, Watanabe H , Bouche Y, Alam M	Major tdh(+) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> serotype changes temporally in the Bay of Bangladesh	Infect Genet Evol	41	153-159	2016
Rashid MU, Rashed SM, Islam T, Johura FT, Watanabe H , Ohnishi M, Alam M.	CtxB1 outcompetes CtxB7 in <i>Vibrio cholerae</i> O1, Bangladesh.	J Med Microbiol	65	101-103	2016
Suzuki, S., Ohnishi, M., Kawanishi, M. , Akiba, M., and Kuroda, M.	Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene mcr-1	Lancet Infect Dis	16	284-285	2016
Kawanishi, M. , H. Abo, M. Ozawa, M. Uchiyama, T. Shirakawa, S. Suzuki, A. Shima, A. Yamashita, T. Sekizuka, K. Kato, M. Kuroda, R. Koike, and M. Kijima.	Prevalence of colistin-resistance gene mcr-1 and absence of mcr-2 in <i>Escherichia coli</i> isolated from healthy food producing animals in Japan.	Antimicrob Agents Chemother	27	61	2016

Hiki M, Shimizu Y, <u>Kawanishi M</u> , Ozawa M, Abo H, Kojima A, Koike R, Suzuki S, Arisai, T, Hamamoto S.	Evaluation of the relationship between the minimum inhibitory concentration of ceftiofur and third generation cephalosporins in <i>Escherichia coli</i> isolates from food-producing animals.	J. vet. diagnosis. invest	In press		2017
菅 美樹、四宮博人、北尾孝司	市販鶏レバーおよび臨床材料から分離した基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生 <i>Escherichia coli</i> および <i>Klebsiella pneumoniae</i> が保有する <i>bla</i> _{CTX-M} 型別に関する検討	感染症学雑誌	90 (3)	305-9,	2016
浅井鉄夫	耐性菌とは？養豚の課題は何？	Pig Journal	19 (12)	15-17	2016
山本詩織、朝倉宏、五十君静信	基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生菌に関わる最近の動向とその拡散に関する考察～食品汚染実態とその危害性について～	食品衛生学雑誌	印刷中		
Kurushima J, Ike Y, <u>Tomita H</u> .	Diversity Generates Effector Immunity Specificity of the Bac41-Like Bacteriocins of <i>Enterococcus faecalis</i> Clinical Strains.	Journal of Bacteriology.	198	2379-2390	2016